

Universidade Federal do Espírito Santo  
Centro de Ciências da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

**Mainã Mantovanelli da Mota**

**Estresse oxidativo em  
*Saccharomyces cerevisiae* submetida à  
alta pressão hidrostática**

VITÓRIA

2015

**Mainã Mantovanelli da Mota**

**Estresse oxidativo em  
*Saccharomyces cerevisiae* submetida à  
alta pressão hidrostática**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Patricia Machado Bueno Fernandes.

**VITÓRIA  
2015**

**Mainã Mantovanelli da Mota**

**Estresse oxidativo em  
*Saccharomyces cerevisiae* submetida à  
alta pressão hidrostática**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Comissão Examinadora

---

Profª Drª. Patricia Machado Bueno Fernandes  
Universidade Federal do Espírito Santo  
Orientadora

---

Prof. Dr. Antonio Alberto Ribeiro Fernandes  
Universidade Federal do Espírito Santo  
Coorientador

---

Profª Drª Monica Montero Lomeli  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

Profª Drª Surama Freitas Zanini  
Universidade Federal do Espírito Santo

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)  
(Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade  
Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

---

M917e Mota, Mainã Mantovanelli da, 1990 -  
Estresse oxidativo em *Saccharomyces cerevisiae* submetida  
à alta pressão hidrostática / Mainã Mantovanelli da Mota – 2015.  
72 f. : il.

Orientador: Patricia Machado Bueno Fernandes.  
Coorientador: Antonio Alberto Ribeiro Fernandes.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade  
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Estresse oxidativo. 2. *Saccharomyces cerevisiae*.  
3. Pressão Hidrostática. 4. Citometria de fluxo. I. Fernandes,  
Patricia Machado Bueno. II. Fernandes, Antonio Alberto Ribeiro.  
III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências  
da Saúde. IV. Título.

CDU: 61

---

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à minha orientadora Profa. Dra. Patricia Machado Bueno Fernandes, a quem sou imensamente grata pela oportunidade que me concedeu de fazer parte do laboratório e que durante esses quatro anos dedicou o seu tempo para me orientar de forma crítica e com toda a liberdade para pensar e realizar os experimentos.

Ao Prof. Dr. A. Alberto Ribeiro Fernandes pelo seu empenho em manter o crescimento do Laboratório de Biotecnologia Aplicada ao Agronegócio (LBAA), pelos seus ensinamentos e pelas suas inestimáveis contribuições que possibilitaram a elaboração deste trabalho.

À Dra. Fernanda Bravim pela sua dedicação e paciência, que desde o começo nunca hesitou em repassar os seus conhecimentos.

A todos os amigos LBAA, aos antigos e atuais, pelo apoio e aprendizado. Em especial aos meus amigos que me acompanham desde a graduação, Jean e Lorena, muito obrigada pelos bons momentos, pelas palavras de motivação, conselhos e pelo ótimo convívio que tivemos.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia pelo apoio e ensinamentos.

Às professoras Dra. Monica Montero Lomeli e Dra. Surama Freitas Zanini por aceitarem participar da banca e pelo tempo dedicado às correções do trabalho.

À Kárita e Sarah da Secretaria do PPGBiotec da UFES pela atenção e carinho com que sempre nos atenderam.

À minha mãe, Sandra, que foi a maior responsável pela minha chegada até aqui e que sempre me incentivou por acreditar na minha competência, nada do que disser vai ser suficiente para agradecer a sua dedicação, enfim muito obrigada por diversas vezes ter abdicado de seus planos e vontades em benefício dos meus estudos.

Ao meu pai, Adilson, pelos seus cuidados, motivação e apoio de sempre. Às minhas irmãs, Paula e Manuela, pela amizade e conselhos que me motivaram a trilhar este caminho.

Ao meu noivo, Claudio Júnior, que sempre torceu e vibrou com as minhas conquistas e compartilhou comigo mais uma etapa da minha trajetória. Muito obrigada por seu amor incondicional e por ter compreendido a minha ausência por diversas vezes.

A todos os meus amigos com os quais quero compartilhar esta vitória.

As agências de fomento, FINEP, CNPq, CAPES, FAPES pelo apoio financeiro e bolsa de estudo que viabilizou o desenvolvimento deste trabalho.

## RESUMO

*Saccharomyces cerevisiae* foi o primeiro organismo eucarionte a ter seu genoma completamente sequenciado e vem sendo utilizada há várias décadas como um modelo para estudos celulares e moleculares. *S. cerevisiae*, representa um dos microrganismos mais empregados nas indústrias de fermentação. Durante a fermentação alcoólica, as células da levedura *S. cerevisiae* são expostas a muitas condições distintas de estresse que afetam seu metabolismo, dentre os quais podemos citar o estresse osmótico, o aumento da temperatura e o acúmulo de etanol; e para se obter maior produtividade é necessária a introdução de linhagens resistentes a estresse e com alto poder fermentativo. A alta pressão hidrostática (HHP) é um estresse que pode influenciar importantes processos fisiológicos e bioquímicos na *S. cerevisiae* com efeitos similares a outros estresses, incluindo o estresse oxidativo. O presente trabalho tem por objetivo compreender a resposta à alta pressão hidrostática em cepa de destilaria de *S. cerevisiae* com enfoque na via de resposta ao estresse oxidativo. Os efeitos da HHP no acúmulo de espécies reativas de oxigênio nas células de *S. cerevisiae*, foram analisados por citometria de fluxo utilizando a sonda fluorescente CM-H<sub>2</sub>DCFDA. Ao se difundir para o interior da célula, o CM-H<sub>2</sub>DCFDA é clivado por esterases intracelulares formando produto não fluorescente que se acumula intracelularmente e a sua subsequente oxidação, forma um produto altamente fluorescente. Essas características nos permite inferir que um aumento na intensidade de fluorescência, detectada por citometria implica em um maior acúmulo de espécies reativas na célula. Estudos foram conduzidos com células submetidas ao tratamento de alta pressão hidrostática de 50 MPa por 30 minutos, posteriormente procedeu-se com a análise por citometria de fluxo. Os resultados obtidos demonstraram que células expostas ao tratamento de pressão exibiram maior intensidade de fluorescência, consequentemente apresentaram maior acúmulo de espécies reativas, quando comparadas com amostra controle não pressurizada, demonstrando portanto que HHP desencadeia um estresse oxidativo nas células. Visando a comparação do efeito de diferentes estresses na geração de espécies reativas, procedeu-se com a avaliação por citometria de fluxo em células de leveduras submetidas a diferentes condições de estresse. Os resultados mostraram que não houve diferença significativa na intensidade de fluorescência entre as células submetidas aos estresses térmico, etanólico e osmótico e o grupo controle, sugerindo que essas condições de injúria causem estresse oxidativo, mas as células são capazes de responder imediatamente após serem submetidas aos estresses, no sentido de induzir mecanismos de resposta aos danos oxidativos que previnem o acúmulo de espécies reativas. Diferentemente da alta pressão hidrostática que exige das células um período de recuperação após o tratamento para induzir mecanismos de resposta ao estresse oxidativo. As análises de expressão gênica por qRT-PCR demonstraram um aumento na expressão de genes

relacionados ao estresse oxidativo 15 min após o piezotratamento, confirmando esta hipótese. Posteriormente, foi realizada análise do acúmulo de espécies reativas após o tratamento de HHP em linhagem que superexpressa o gene *STF2* (BT0510-pSTF2), que codifica uma proteína hidrofílica que exibe propriedades antioxidantes. BT0510-pSTF2 apresentou uma menor intensidade de fluorescência comparado com a linhagem selvagem. Esses resultados reforçam a importância da resposta ao estresse oxidativo na indução de resistência ao tratamento de alta pressão hidrostática.

Palavras-chave: Alta pressão hidrostática (HHP), *Saccharomyces cerevisiae*, estresse oxidativo, citometria de fluxo



## ABSTRACT

*Saccharomyces cerevisiae* was the first eukaryotic organism to have its genome sequenced and has been used for several decades as a model for cellular and molecular studies. The yeast *S. cerevisiae* is the most important microorganism used in the biotechnological industries. During alcoholic fermentation, the yeast *S. cerevisiae* cells are exposed to several stress conditions that may decrease their viability, including osmotic stress, high temperature and accumulation of ethanol over the process; thus, stress tolerant yeast strains with a high ethanol production are desirable to achieve high productivity. High hydrostatic pressure (HHP) stress may influence important physiological and biochemistry processes in *S. cerevisiae* in a similar way to others stress including oxidative stresses. The objective of this study was to evaluate the response to high hydrostatic pressure in distillery strain of *Saccharomyces cerevisiae* with focusing on response pathway to oxidative stress. The effects of HHP in the increase accumulation of reactive oxygen species in cells of *S. cerevisiae* were analyzed by flow cytometry using the fluorescent probe CM-H<sub>2</sub>DCFDA. Intracellular esterases cleave CM-H<sub>2</sub>DCFDA producing non-fluorescent molecule and subsequent oxidation yields highly fluorescent product. These features enable infer that an increase in intensity of fluorescence detected by flow cytometry implies a greater accumulation of reactive oxygen species in the cell. Studies were conducted with cells subjected to high hydrostatic pressure treatment of 50 MPa for 30 minutes, then proceeded to the analysis by flow cytometry. The results demonstrated that cells exposed to pressure treatment exhibited a higher fluorescence intensity, consequently showed a higher accumulation of reactive species in the cells, compared to the control sample untreated cells. Demonstrating thus that HHP promotes an important oxidative stress in the yeast cells. In order to compare the effect of different stresses on the generation of reactive species proceeded to the analysis by flow cytometry in yeast cells subjected to different stress conditions. The results showed no significant difference in fluorescence intensity in cells submitted to heat shock, osmotic stress and of ethanol. However, is suggested that these injury conditions promote an oxidative stress, but the cells are able to respond immediately upon being subjected to these stresses, in order to induce response mechanisms to oxidative damage that prevent the accumulation of reactive species. Differently of the HHP that requiring a cell recovery period after treatment to induce more effective mechanism of the oxidative stress response. Analysis of gene expression levels related to oxidative stress, after pressure treatment was carried out by RT-PCR. It was observed that expression of genes is increased when the cells are incubated at ambient pressure after treatment with HHP, leads to less accumulation of reactive species in the cells maintained at ambient pressure after the HHP treatment, observed by flow cytometry analysis. To understand the effect of HHP in the pathway oxidative stress response, was carried

accumulation analysis of reactive oxygen species following HHP treatment comparing a wild strain (BT0510) with a modified strain that overexpressed a gene STF2 (BT0510-pSTF2), this gene encodes a hydrophilic protein that present antioxidant properties. BT0510-pSTF2 more efficiently responds to oxidative stress induced by HHP, because it was observed that BT0510-pSTF2 shows a lower fluorescence intensity compared to the wild type strain BT0510.

Keywords: High Hydrostatic Pressure (HHP), *Saccharomyces cerevisiae*, oxidative stress, flow cytometry

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Micrografias representando a morfologia e estrutura de <i>Sacharomyces cerevisiae</i> .....	17
Figura 2: Representação esquemática das diferentes respostas moleculares e fisiológicas de <i>S. cerevisiae</i> mediante alterações do ambiente.....	21
Figura 3: Representação esquemática da cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria e produção de superóxido. ....	30
Figura 4: Mecanismo molecular de regulação para o acúmulo do fator de transcrição YAP1 no núcleo.....	30
Figura 5: Reação de redução do peróxido de hidrogênio a água catalisada pela catalase.....	31
Figura 6: Reação de conversão do ânion superóxido ( $O_2^-$ ) em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) catalisada pela superóxido dismutase (SOD). ....	32
Figura 7: Sistema Tio redoxina.....	32
Figura 8: Reação de redução do peróxido a água pela glutathiona reduzida (GSH)..	33
Figura 9: Histograma da intensidade de fluorescência emitida pelo corante CM-H <sub>2</sub> DCFDA em células de <i>S. cerevisiae</i> submetida ao tratamento de 50 MPa por 30 min. ....	45

Figura 10: Representação em gráfico de barras do acúmulo de espécies reativas em células de <i>S. cerevisiae</i> submetidas ao tratamento de 50 MPa por 30 min. ....	46
Figura 11: Representação esquemática da lançadeira glicerol-3-fosfato. ....	47
Figura 12: Histograma da intensidade de fluorescência emitida pelo corante CM-H <sub>2</sub> DCFDA em células de <i>S. cerevisiae</i> submetida a diferentes tratamentos por 30 min. ....	48
Figura 13: Representação do acúmulo de espécies reativas em células de <i>S. cerevisiae</i> sob diferentes estresse. ....	49
Figura 14: Representação da sobrevivência celular em células de <i>S. cerevisiae</i> submetida a diferentes estresses por 30 min. ....	51
Figura 15: Viabilidade celular de suspensões celulares de leveduras submetidas a diferentes tratamentos a partir da representação por dot plots. ....	53
Figura 16: : Histograma da intensidade de fluorescência emitida pelo corante CM-H <sub>2</sub> DCFDA em células de <i>S. cerevisiae</i> submetida a diferentes tratamentos por 60 min. ....	54
Figura 17: Histograma da intensidade de fluorescência emitida pelo corante CM-H <sub>2</sub> DCFDA em células de <i>S. cerevisiae</i> submetida ao tratamento de alta pressão hidrostática de 50 MPa por 30 min e 50 MPa por 30 min seguido de incubação à pressão ambiente por 15 min. ....	56

Figura 18: Representação do acúmulo de espécies reativas em células de *S. cerevisiae* após tratamento de pressão de 50 MPa por 30 min e tratamento de pressão de 50 MPa por 30 min seguido de incubação à pressão ambiente por 15 min. ....57

Figura 19: Representação esquemática da via das pentoses fosfato com a geração de NADPH.....59

Figura 20: Nível de expressão relativa (RQ) dos genes por análise de RT-PCR em tempo real após tratamento de pressão de 50 MPa por 30 min e 50 MPa por 30 min seguido de incubação à pressão ambiente. ....60

Figura 21: Histograma da intensidade de fluorescência emitida pelo corante CM-H<sub>2</sub>DCFDA entre as linhagens de *S. cerevisiae* BT0510 e BT0510-pSTF2.....62

Figura 22: Representação do acúmulo de espécies reativas em células de *S. cerevisiae* das linhagens BT0510 e BT0510-pSTF2. ....63

## **LISTA DE SIGLAS**

APE = Elemento de resposta ao estresse oxidativo  
ATP = Adenosina trifosfato  
cDNA = Ácido desoxirribonucléico complementar  
CM-H<sub>2</sub>DCFDA = Marcador fluorescente de estresse oxidativo  
D.O. = Densidade óptica  
DMSO = Dimetilsulfóxido  
ESR = Resposta ao estresse ambiental  
G418 = Geneticina  
GSH = Glutathione  
HHP = Alta pressão hidrostática  
HSF1 = Fator transcricional de choque térmico  
Hsp = Proteína de choque térmico  
MPa = Megapascal  
Msn2/4 = Fatores de transcrição de estresse  
NADH = Nicotinamida adenina dinucleotídeo  
NADPH = Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfatada  
PCR = Reação em cadeia da polimerase  
PI = Iodeto de Propídio  
ROS = Espécies reativas de oxigênio  
rpm = Rotação por minuto  
RNA = Ácido ribonucléico  
RT = Transcriptase reversa  
STRE = elemento de resposta ao estresse  
TrX = Tiorredoxina  
YAP1 = Fator de transcrição de resposta ao estresse oxidativo  
YEPD = Extrato de levedura, peptona e dextrose

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
1.1. A LEVEDURA <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	16
1.1.1. <b>Caracterização: Estrutura e metabolismo</b> .....	17
1.1.2. <b><i>S. cerevisiae</i> como modelo e sua aplicação biotecnológica</b> .....	19
1.2. RESPOSTA GERAL AO ESTRESSE .....	21
1.3. ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA .....	24
1.4. EFEITOS DA ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA EM <i>S. cerevisiae</i> .....	26
1.5. RESPOSTA A ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA .....	27
1.6. ESTRESSE OXIDATIVO EM <i>S. cerevisiae</i> .....	29
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>35</b>
2.1. OBJETIVO GERAL .....	35
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
<b>3. METODOLOGIA.....</b>	<b>36</b>
3.1. MICRORGANISMO E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO .....	36
3.2. TRATAMENTOS.....	36
3.2.1. <b>Estresse térmico, osmótico e de etanol</b> .....	36
3.2.2. <b>Alta pressão hidrostática</b> .....	37
3.3. ANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO .....	37
3.3.1. <b>Viabilidade</b> .....	38
3.3.2. <b>Acumulo de espécies reativas</b> .....	39
3.4. EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-PCR EM TEMPO REAL .....	40
3.5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	42
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>44</b>

4.1.ACÚMULO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO APÓS O PIEZOTRATAMENTO .....	44
4.2.COMPARAÇÃO DO PIEZOTRATAMENTO COM OS OUTROS ESTRESSES .	47
4.3.ESTRESSE OXIDATIVO APÓS O PIEZOTRATAMENTO SEGUIDO POR INCUBAÇÃO À PRESSÃO AMBIENTE .....	55
4.4.EXPRESSÃO GÊNICA.....	57
4.5.COMPARAÇÃO DO ACUMULO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO DAS LINHAGENS SELVAGEM E MODIFICADA APÓS O PIEZOTRATAMENTO .....	61
<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>65</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>67</b>



# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. A LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae*

Leveduras são fungos unicelulares, portanto, organismos eucariontes, heterotróficos, imóveis e com parede celular definida. Pertencem majoritariamente ao grupo dos Ascomycetos, e exibem uma grande heterogeneidade com relação ao tamanho celular, forma, cor e divisão sexual, mesmo entre indivíduos da mesma linhagem, essas características são sensíveis às condições ambientais (FERNANDES et al., 2009).

A levedura *S. cerevisiae* pertence à classe Saccharomycetes, à ordem Saccharomycetales, à família Saccharomycetaceae e à subfamília Saccharomycetoidea, que engloba 26 gêneros (Figura 1). O gênero *Saccharomyces* possui algumas características peculiares que o caracteriza, sendo que todas as espécies possuem uma alta capacidade fermentativa, se dividem por gemulação ou brotamento, processo no qual a nova célula se forma como uma pequena gêmula na célula mãe, cresce até separar-se dela. Após a divisão celular, a célula filha deixa na célula mãe uma cicatriz de nascimento. O número de cicatrizes de gemas presentes na parede celular representa a idade genealógica da célula. As células de *S. cerevisiae* possuem forma elipsoidal, um tamanho que pode variar entre 1-10  $\mu\text{m}$  e a média de volume é de 29 ou 55  $\mu\text{m}^3$  para uma célula haploide ou diploide, respectivamente, sendo que o tamanho celular aumenta com a idade (FERNANDES et al., 2009; KREGER-VAN RIJ, 1987).

*S. cerevisiae* é comumente conhecida por levedura de brotamento, e este nome deriva da característica notável da divisão celular e a distingue da levedura de fissão, *Schizosaccharomyces pombe*, que também é muito utilizado como organismo modelo. *S. cerevisiae* pode apresentar dois modos de reprodução, a reprodução assexuada por brotamento, que consiste no modo mais comum de propagação vegetativa em leveduras, ou pode ainda se reproduzir sexuadamente pelo fusão de células haploides de tipos sexuais opostos,  $\alpha$  e  $a$ . A célula diploide pode se reproduzir vegetativamente ou em condições de restrição de nutrientes, induzidas a sofrer meiose e esporulação, formando quatro esporos haploides, dois de cada tipo sexual.

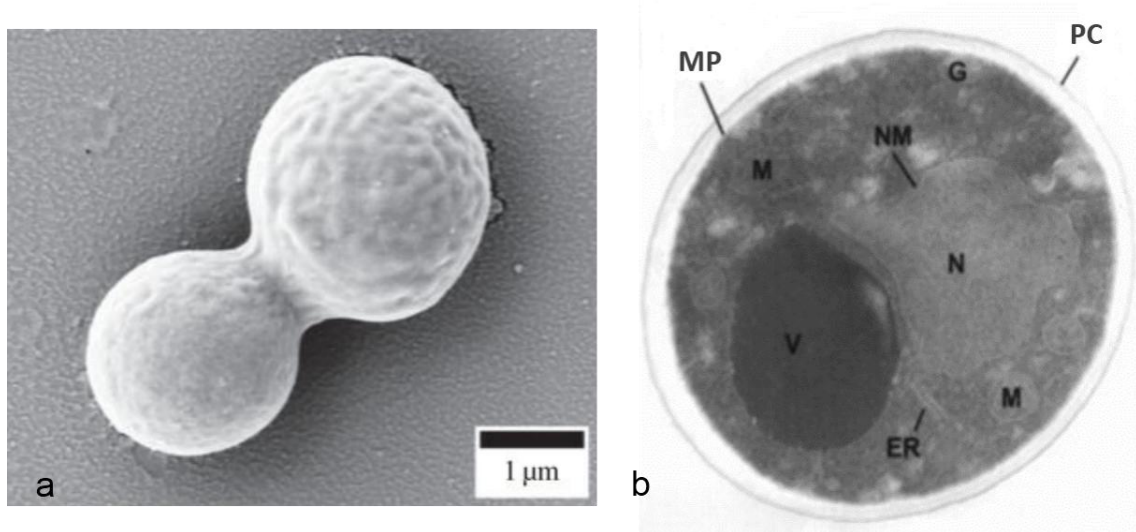


Figura 1: Micrografias representando a morfologia e estrutura de *Sacharomyces cerevisiae*. (a) Imagem por microscopia eletrônica de varredura. (b) Célula a pressão atmosférica por microscopia eletrônica de transmissão de 0,8 µm. PC, parede celular; MP, membrana plasmática; NM, membrana nuclear; N, núcleo; V, vacúolo; M, mitocôndria; G, complexo de golgi; ER, retículo endoplasmático (FERNANDES et al. 2001; NOWLIN et al. 2014).

Uma grande diversidade de linhagens de *S. cerevisiae* ocorre na natureza. Curiosamente, apesar de serem da mesma espécie, podem ser muito diferentes umas das outras quanto ao seu genótipo e fenótipo. Apresentam ampla dispersão no meio ambiente, podendo ser encontradas em folhas, flores, frutos em decomposição, locais como padarias, cervejarias, destilarias e indústrias produtoras de etanol combustível, e possuem características adaptadas à fonte energética e ao papel ecológico em cada habitat que ocupam (NEVOIGT, 2008).

#### 1.1.1. Caracterização: Estrutura e metabolismo

As leveduras possuem uma parede celular definida, e a composição da parede celular das leveduras, consiste basicamente de polissacarídeos de glicose, um polímero de  $\beta$ -1,3 e  $\beta$ -1,6 glucanas (48-60%), manoproteínas (20-23%) e quitina, um polímero de  $\beta$ -1,4 N-acetilglicosamina (0,6-2,7%). A parede celular possui duas camadas principais: uma externa, composta de manoproteínas e uma interna, de glicose. A camada de manoproteínas tem função de proteger a célula contra fatores externos e é responsável pela porosidade da parede celular, enquanto que a camada de glicose

é responsável pela estrutura da parede celular perante choques mecânicos e desequilíbrios osmóticos (FLEURI *et al.*, 2005).

A parede celular de *S. cerevisiae* contém mais de 20 tipos de manoproteínas que desempenham papéis diferentes na construção, preservação, modificação da estrutura e interação das células com suas adjacências como, por exemplo, as interações intercelulares durante a aglutinação ou floculação. Em leveduras, a quitina é encontrada predominantemente em septos primários e em volta do círculo de constrição entre a célula mãe e a célula-filha. Cerca de 90% da quitina está localizada na cicatriz de brotamento e o restante, na parede celular (FLEURI *et al.*, 2005).

As leveduras, assim como os demais organismos, precisam de energia química necessária à manutenção da vida, crescimento e reprodução, sendo que a maior parte da energia utilizada pelas células provém da energia química contida na molécula de adenosina trifosfato (ATP). O metabolismo das leveduras refere-se à assimilação bioquímica e degradação dos nutrientes pelas células. No processo de degradação, que correspondem às vias catabólicas, os substratos são degradados pelas células gerando energia na forma de ATP, sendo acoplado a geração de intermediários e poder redutor na forma de NADH e NADPH. Já na biossíntese, que representa as vias anabólicas, as células utilizam os produtos intermediários, o poder redutor e a energia que produziram para síntese de novos materiais celulares (FERNANDES *et al.*, 2009; TARGINO, 2009).

Além disso, as leveduras da espécie *S. cerevisiae* consistem em organismos anaeróbios facultativos, demonstrando metabolismo tanto respiratório quanto fermentativo. No entanto, o metabolismo fermentativo predomina sobre o respiratório quando as concentrações de açúcares estão elevadas, mesmo sob condições aeróbicas. Esse comportamento metabólico é provocado por um efeito conhecido como repressão catabólica, sendo que as altas concentrações de glicose inibe a expressão de genes envolvidos na via respiratória, fazendo com que o piruvato seja reduzido a etanol pelo processo fermentativo (FERNANDES *et al.*, 2009; TREVISOL *et al.*, 2011).

A levedura *S. cerevisiae* apresenta fases distintas de crescimento, sendo que a primeira fase corresponde a uma fase de adaptação fisiológica das células ao novo ambiente no qual elas foram introduzidas, nesta fase o metabolismo das células está ativo criando condições ideais para a divisão celular. Na segunda fase de crescimento,

a presença da glicose reprime a expressão dos genes que codificam enzimas da via respiratória e de genes que codificam enzimas envolvidas no catabolismo de outras fontes de carbono, e então a célula utiliza a fermentação da glicose como única via energética e a taxa de crescimento é alta. Ao ser consumida toda a glicose, o ciclo celular é interrompido e genes envolvidos na via aeróbica do metabolismo são induzidos. Começa então a segunda fase exponencial ou fase respiratória. Durante esta fase, a célula utiliza outras fontes de carbono para gerar energia. O etanol e outros subprodutos da fermentação serve como importante fonte de carbono para as células continuar seu crescimento. Quando todas as fontes de carbono se esgotam, as células entram na fase estacionária e nessa fase as células acumulam açúcares de reserva como glicogênio e trealose, além de proteínas de defesa conhecidas como proteínas de choque térmico (Hsps) (FELDMAN, 2012).

#### **1.1.2. *S. cerevisiae* como modelo e sua aplicação biotecnológica**

*Saccharomyces cerevisiae* foi o primeiro organismo eucarioto a ter seu genoma completamente sequenciado, com 16 cromossomos lineares contendo 12 Mb de bases nitrogenadas e aproximadamente 6000 genes (GOFFEAU et al., 1996). Nenhum outro organismo eucarioto possui tamanha riqueza de detalhes moleculares sobre sua bioquímica e fisiologia, por isso tem sido utilizado também como organismo modelo pela comprovada similaridade dos mecanismos de replicação, recombinação, divisão celular e produção de metabólitos com os organismos superiores, sendo que cerca de 30% dos genes conhecidos envolvidos em doenças humanas homólogos no genoma da levedura, muitos dos quais possuem uma ligação com os genes de doenças humanas (FERNANDES, 2005; KARATHIA et al., 2011).

Apesar de simples, a levedura *S. cerevisiae* é um organismo conservado evolutivamente e apresenta muitas vantagens em sua utilização, como o genoma pequeno, sendo cerca de 200 vezes menor do que o genoma humano, possui curto ciclo de vida, de aproximadamente 90 minutos, é de fácil manutenção laboratorial e genética. Devido ao fato de serem facilmente manipuladas geneticamente, modernas tecnologias de DNA recombinante permitem a utilização desta levedura como principal fonte de produção de proteínas como insulina, interferon ou hormônio de crescimento, e por isso, genes de mamíferos, principalmente humanos, podem ser introduzidos nas

leveduras para análises de suas funções e de seus produtos (FERNANDES et al., 2009).

A história de associação das leveduras com o desenvolvimento da civilização é bastante longa, estes microrganismos apresentam uma ampla aplicação industrial, como no setor de alimentos e bebidas, são também fornecedoras de enzimas, proteínas e compostos químicos, além disso constituem uma importante fonte de proteína e de fatores de crescimento, passível de ser utilizada na alimentação animal e mesmo humana. Outros exemplos de metabólitos de interesse comercial produzidos pelo microrganismo são ácido cítrico, ácido glucônico, aminoácidos, vitaminas, polissacarídeos e micronutrientes como o selênio. A importância das leveduras estende-se também para o setor da saúde, sendo utilizadas em biosensores, bioterapêutica, biofarmácia, estando ainda presente na área ambiental, como por exemplo, no tratamento de efluentes industriais (ARAÚJO et al., 2009; TARGINO, 2009).

As leveduras são as responsáveis direta pela decomposição do açúcar em álcool etílico e dióxido de carbono, principalmente a levedura *S. cerevisiae*. Justamente por isso, estes microrganismos são utilizados há milênios na produção de pães e bebidas alcoólicas, por isso, se fazem presentes nas casas de milhões de famílias no mundo todo (FERNANDES et al., 2009).

Uma vasta quantidade de processos biotecnológicos realizados atualmente, fazem uso da levedura *S. cerevisiae*. Isso se dá em decorrência, principalmente, à sua alta adaptabilidade às alterações ambientais, ajustando rapidamente seu metabolismo para lidar com tais variações e também à sua extraordinária capacidade em produzir etanol, a sua tolerância a baixos valores de pH, a alta concentração de açúcar e de etanol (NEVOIGT, 2008).

Considerando a relevância da levedura *S. cerevisiae* em diversos processos biotecnológicos e a sua capacidade de adaptação a diversas condições ambientais, uma variedade de estudos tem sido realizados com a finalidade de entender os mecanismos fisiológicos de resistência ao estresse, bem como promover o melhoramento das cepas utilizadas industrialmente a fim de aumentar a produtividade dos processos fermentativos.

## 1.2. RESPOSTA GERAL AO ESTRESSE

Para compreender como um organismo pode se adaptar a uma condição de estresse, primeiramente precisa-se compreender o que é o estresse. Todo organismo possui uma condição ótima de crescimento, na qual as atividades metabólicas e a razão de crescimento mantêm-se constantes. E o estresse é referido como o desvio destas condições normais, que vai induzir uma particular resposta celular ao dano causado. Os principais estresses físicos nos organismos são temperatura, pressão, dissecação, acidez ou alcalinidade, estresse osmótico e iônico, além dos baixos níveis de oxigênio (HOHMANN; MAGER, 2003; FERNANDES, 2008).

Respostas ao estresse são particularmente importantes em microrganismos, pois o ambiente é altamente variável e as condições como, osmolaridade, temperatura ou disponibilidade de nutrientes estão longe de serem constantes. Alterações no meio externo podem interferir no correto funcionamento das atividades celulares, assim, as células devem ser capazes de proteger e manter a homeostasia interna, em face da variação das condições externas. Uma mudança abrupta nas condições ambientais conduz a um rápido ajuste no metabolismo e no programa de expressão gênica para que a célula se adapte a essa nova situação (Figura 2) (ESTRUCH, 2000; GASH, 2003; ROKHLENKO *et al.*, 2006).

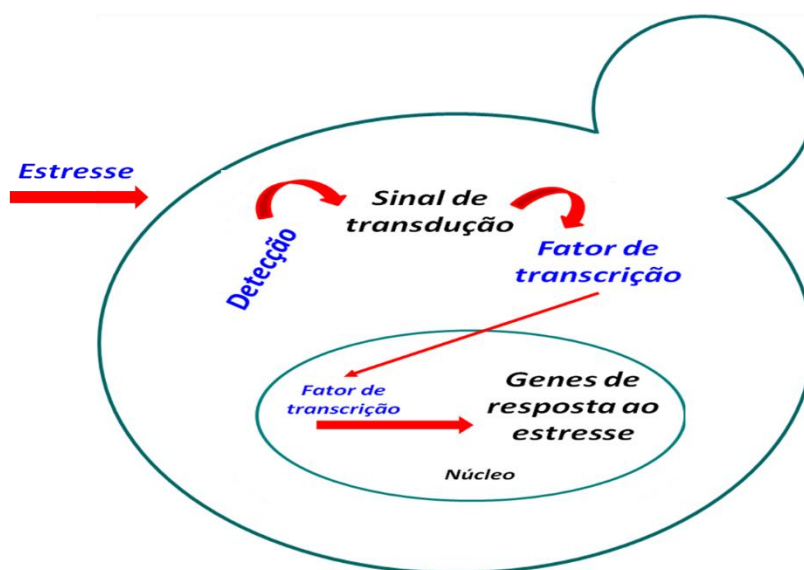


Figura 2: Representação esquemática das diferentes respostas moleculares e fisiológicas de *S. cerevisiae* mediante alterações do ambiente (Adaptado: Querol, et al. 2003).

Tendo em vista que diversos processos biotecnológicos e tradicionais de produção de alimentos que utilizam as leveduras, expõem as células a simultâneas ou sequenciais combinações de diferentes estresses ambientais, como o estresse térmico, de etanol e de pressão osmótica, é extremamente desejável que as leveduras industriais sejam resistentes a múltiplos estresses.

A levedura *S. cerevisiae* tornou-se um organismo modelo de estudo para compreensão da resposta das células eucariotas ao estresse, e os estudos com essa levedura possibilitou também a definição do papel específico de algumas proteínas induzidas durante o estresse. O elevado grau de conservação evolutiva das vias de resposta ao estresse entre a levedura *S. cerevisiae* e os eucariotos superiores, nos permite considerar a levedura como sistema modelo adequado para a caracterização da resposta ao estresse em organismos mais complexos (ESTRUCH, 2000).

A resposta celular ao estresse acontece em três fases distintas. Na primeira fase, a imediata mudança ocorre como uma consequência direta à exposição ao estresse e ao dano causado por ele. Os processos de defesa ocorrem na segunda fase, e interessante, muitas vezes os mesmos mecanismos podem ser requeridos pelas células em diferentes situações de estresse. Por fim, a terceira fase engloba a adaptação e retomada da proliferação celular, dependendo do tipo de estresse, estas fases podem ou não serem facilmente definidas (HOHMANN; MAGER, 2003).

Os mecanismos de resposta ao estresse têm a função de proteger a célula dos danos causados pelas condições adversas, por conseguinte, atuam no reparo de danos produzidos pelo estresse e também conduzem a célula a adquirir uma tolerância ao estresse, estabelecendo assim formas de prevenção para evitar maiores danos à célula. (HOHMANN; MAGER, 2003; STRASSBURG, *et al.*, 2010).

Um importante aspecto da resposta ao estresse de células de levedura, é o chamado fenômeno de proteção cruzada, este permite que as células expostas a uma dose suave de um estresse, tornem-se resistentes a uma dose letal de outros estresses. Desta forma, observa-se que o pré-tratamento das células de levedura com um suave choque térmico conduz a uma proteção da célula contra muitos estresses severos. A ocorrência do fenômeno de proteção cruzada sugere a existência de uma resposta celular comum a diferentes condições de estresse, como o ajuste do metabolismo energético, a produção de proteínas protetoras principalmente as proteínas de choque

térmico, além da produção de pequenas moléculas tais como o glicerol, glicogênio e trealose (ESTRUCH, 2000; FOLCH-MALLOL et al., 2004).

Entretanto, a resistência à alta pressão hidrostática só é adquirida se as células forem incubadas à pressão ambiente por um curto período, antes de serem expostas ao estresse mais severo. O efeito de proteção é visto depois de 15 minutos de incubação à pressão atmosférica, persistindo o efeito por uma hora quando o estresse posterior é a própria pressão hidrostática ou o tratamento das células com temperatura baixa, porém o tempo de proteção observado quando as células são submetidas ao tratamento de calor é muito curto (PALHANO et al., 2004a).

A resposta geral das células ao estresse é regulada pelo Elemento de Resposta ao Estresse (STRE do inglês Stress Response Element), localizado na sequência promotora de uma variedade de genes induzidos por estresse. Tais genes são divididos em dois grupos: aqueles cujo nível de expressão aumenta depois de ter sido exposto a um agente estressante, e genes em que a transcrição diminui em resposta ao estresse. Em geral, as funções biológicas representadas pelo grupo de genes regulados negativamente estão associados com a síntese de proteínas e crescimento, e as funções associadas com os genes regulados positivamente incluem metabolismo de carboidratos, enovelamento de proteínas, defesa contra agentes oxidantes, reparo do DNA, entre outras (GASH, 2003).

Os elementos de resposta ao estresse são controlados pelos fatores de transcrição Msn2/Msn4p. As duas proteínas Msn2 e Msn4 são funcionalmente semelhantes e desempenham um papel chave na regulação da expressão de genes de resposta ao estresse em *S. cerevisiae*. Os fatores de transcrição Msn2p e Msn4p, normalmente estão localizados no citoplasma, entretanto, quando as células são expostas a alguma situação estressante, estes fatores são rapidamente translocados para o núcleo onde se ligam aos STREs para regulação de uma extensa lista de genes de resposta a estresse (GASH et al., 2000; HOHMANN; MAGER, 2003).

Cepas mutantes de *S. cerevisiae*, deletadas no fator de transcrição Msn2/4, demonstraram ser mais sensíveis à pressão que as cepas selvagens, esta sensibilidade é aumentada dependendo do valor e duração do tratamento de pressão, estes resultados também são observados quando as células são submetidas ao choque térmico. No entanto, sob certas condições de estresse os genes identificados como alvos destes fatores foram induzidos independentemente da deleção de Msn2/4,



indicando que os genes de resposta ao estresse são regulados também por outros fatores (BOY MARCOTTE et al. 1999; DOMITROVIC et al. 2006; GASCH, 2003).

Além dos elementos de resposta ao estresse (STRE) que são controlados pelos fatores de transcrição Mns2/Msn4, existem outros dois elementos de controle transcricional que são ativados sob diferentes condições de estresse: o primeiro deles é expresso sob condições de choque térmico (HSEs) e estes são regulados pelo fator de transcrição Hsf1. O segundo são os elementos de resposta ao estresse oxidativo (APEs) reconhecidos por Yap1/Skn7 (ESTRUCH, 2000).

### 1.3. ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA

A pressão é definida como uma força por unidade de área, aplicada em uma dada superfície, sendo a alta pressão hidrostática incluída na categoria em que o mesmo valor de pressão pode ser mantido por um longo período de tempo e os valores aplicados são os mesmos em todas as direções do espaço. Além disso, sabe-se que a alta pressão hidrostática é um importante parâmetro termodinâmico e pequenas alterações nos valores desta variável podem influenciar profundamente os sistemas moleculares, podendo portanto ser considerada como um estresse (FERNANDES, 2005; RIVALAIN *et al.*, 2010).

Os níveis de pressão impostos sobre os sistemas biológicos variam de 0,1 MPa a 110 MPa. Habitats terrestres apresentam pressões de 1 atmosfera [1 atm = 0,101 megapascal (MPa)], mas correspondem menos que 1% do volume total da biosfera. Enquanto os oceanos que cobrem aproximadamente 70% da superfície terrestre possuem uma profundidade média de 3800 m e pressão de 38 MPa, podendo chegar até 110 MPa no ponto mais profundo dos oceanos localizado a 1.1000 m de profundidade nas chamadas Fossas Marianas, localizadas no Oceano Pacífico (SOMERO, 1992).

Há muito tempo acreditou-se que as condições nas profundezas do mar eram muito extremas para suportar qualquer tipo de vida, mas surpreendentemente muitos organismos aquáticos conseguem viver sob pressões hidrostáticas extremamente altas, apesar dos profundos efeitos exercidos pela pressão em uma variedade de estruturas e funções celulares, e em 1995 o termo Piezofílico (piezo = pressão e fílico

= afinidade) foi oficialmente introduzido por Yayanos (YAYANOS, 1995; SIMONATO et al., 2006).

A alta pressão hidrostática (HHP) é uma das mais promissoras tecnologias utilizadas no tratamento e preservação de alimentos, e embora não seja uma tecnologia recente, pois foi empregada por Hite em 1899 como uma forma de conservação do leite por longos períodos, foi apenas no início da década de 1990 que se consolidou como uma ferramenta biotecnológica na descontaminação de alimentos. O método tradicional de descontaminação de alimentos utilizado ainda é através de altas temperaturas. Entretanto a alta pressão hidrostática apresenta diversas vantagens quando comparada à descontaminação por altas temperaturas, visto que não causa mudanças nas características organolépticas originais dos alimentos, diferentemente de quando se emprega altas temperaturas para descontaminação de alimentos (LOPES *et al.*, 2010).

A aplicação da alta pressão hidrostática gera efeitos únicos nos sistemas sob os quais é aplicada, podendo, levar à formação de produtos com novas propriedades funcionais. A potencialidade dessa técnica e o emprego em diferentes campos torna seu estudo muito atrativo para pesquisadores de diferentes áreas (SCHUWARTZ et al., 2011).

Além do uso na descontaminação de alimentos, a alta pressão hidrostática tem sido aplicada em uma variedade de processos biotecnológicos, que incluem a modulação da atividade enzimática, desagregação proteica, preparação de vacinas, entre outros (AERTSEN *et al.*, 2009). Recentemente, foi demonstrado que a pressão de 50 MPa tornou o processo fermentativo da glicose em etanol por *S. cerevisiae* mais rápido e ainda aumentou o rendimento, quando comparado com a fermentação feita por células à pressão ambiente (BRAVIM *et al.*, 2013).

Uma outra vertente de pesquisa utilizando a alta pressão hidrostática está relacionada com a compreensão dos danos e a resposta de microrganismos a este estresse. A pressão é um parâmetro físico que pode causar aos organismos efeitos relacionados aos outros estresses, tais como a temperatura, o etanol e o estresse oxidativo. A alta pressão hidrostática pode ser considerada como um sistema de estresse controlado, acurado e reprodutível, causando mudanças apenas em uma variável, a redução do volume, de modo que os resultados são mais fáceis de serem interpretados que os obtidos pela variação de temperatura (BRAVIM *et al.*, 2010a).

#### 1.4. EFEITOS DA ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA EM *S. cerevisiae*

A alta pressão hidrostática exerce sobre as células de levedura, efeitos com características semelhantes a outros estresses ambientais comuns, como as altas temperaturas e o etanol, e por isso têm sido utilizada como modelo para estudos que visam a compreensão da resposta da célula ao estresse (BRAVIM, 2013).

O tratamento de pressão provoca uma variedade de efeitos nas leveduras, que interferem com as membranas celulares e, conseqüentemente, com a arquitetura da célula, e os processos de polimerização e desnaturação de proteínas, que induzem vias de sinalização envolvidas na resposta da célula a este estresse. Valores de pressão de 50 MPa não são suficientes para matar ou alterar a morfologia das células de levedura, o efeito desse estresse é mais pronunciado quando as células são submetidas a pressões acima de 100 MPa (FERNANDES, 2005).

Diferentes estresses ambientais, como a temperatura, o etanol, o estresse oxidativo, e osmótico, podem causar alterações nas propriedades físicas dos lípidios das membranas nas células. A alta pressão hidrostática causa danos na membrana plasmática pelo aumento do empacotamento das moléculas de fosfolípidios, fazendo com que os ácidos graxos fiquem ordenados mais firmemente, e por consequência há uma redução da fluidez da membrana e aumento da sua espessura, o que além de interferir nos processos de difusão, ainda pode comprometer a estrutura e a atividade de proteínas de membrana (MENTRÉ; HUI BON HOA, 2001). Um aumento na quantidade de ácidos graxos insaturados pode compensar este efeito e manter a membrana em um estado funcional líquido-cristalino, dessa forma as células podem controlar sua fluidez pela modulação da composição da membrana para manter um ótimo nível de fluidez dentro da matriz lipídica (BENEY; GERVAIS, 2001).

De fato, cepas mutantes de *S. cerevisiae* deletadas no gene *OLE1*, este que codifica uma desaturase que é responsável pela inserção de ligações duplas nas cadeias de ácidos graxos, quando crescidas em meio suplementado com ácido graxo insaturado, se mostraram mais resistentes ao tratamento de pressão quando comparadas com células crescidas em meio contendo um ácido graxo saturado, o ácido palmitoleico,

confirmando que a alteração da fluidez da membrana celular está correlacionada com resistência à pressão em levedura (FREITAS et al., 2012).

A alta pressão hidrostática também afeta a estrutura das proteínas, e são necessários valores de pressões acima de 500 MPa para provocar desnaturação proteica, mas pressões menores, de 20-40 MPa, já são suficientes para induzir importantes modificações conformacionais capazes de levar a alterações na funcionalidade das proteínas (MOLINA-GARCÍA, 2002). A pressão força a inserção de moléculas de água entre domínios hidrofóbicos ou eletricamente carregados das proteínas e promove uma redução do volume ocupado pela macromolécula. Estudos demonstram que a desnaturação causada pela temperatura é geralmente irreversível e leva à agregação, provavelmente, devido ao aumento nas interações hidrofóbicas, enquanto a desnaturação causada pela pressão, dentro de uma faixa limite de valor de pressão menor que 300 MPa, é reversível (FOGUEL; SILVA, 2004).

### 1.5. RESPOSTA A ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA

O tratamento de pressão hidrostática modula muitas vias de sinalização relacionadas com a resposta da célula ao estresse, induzindo e reprimindo uma variedade de genes, de forma a conferir uma proteção às células contra os efeitos prejudiciais da HHP (do inglês High Hydrostatic Pressure). Atualmente tecnologias de análise da expressão gênica global (microarranjo) combinadas com a bioinformática, permite quantificar e caracterizar com muita rapidez o nível transcricional de todos os genes em resposta às mudanças das condições ambientais. Além disso, as análises computacionais dos resultados possibilitam determinar a função e a regulação dos genes, proporcionando uma melhor compreensão das respostas fisiológicas das células (FERNANDES et al., 2005; HIRASAWA et al., 2010).

Análises de microarranjo demonstraram que 274 genes foram afetados após o tratamento de 200 Mpa por 30 minutos, sendo que a maioria dos genes induzidos estão envolvidos com a resposta celular ao estresse ou com o metabolismo de carboidratos, enquanto que a maioria dos genes reprimidos estão relacionados com a progressão do ciclo celular e síntese proteica (FERNANDES et al., 2004). Em contrapartida, em outro estudo foi observado que as células ao serem submetidas a

valores de pressão de 30 MPa por 16 h, um tratamento que não provoca a morte celular, somente uma inibição do crescimento, os genes expressos durante este tratamento estão envolvidos na síntese de lipídios e no metabolismo de aminoácidos (IWAHASHI et al., 2005).

A análise de expressão gênica em leveduras expostas a diferentes condições de estresse, como altas temperaturas, pressão osmótica e estresse de etanol, tem revelado uma regulação estereotipada, denominada de resposta ao estresse ambiental (ESR, do inglês Environmental Stress Response), demonstrando que há um perfil de resposta ao estresse comum em diferentes condições, mas o número de genes regulados na ESR pode variar conforme a intensidade ou tempo de duração de um determinado estresse. Os estudos tem demonstrado que os genes envolvidos na resposta ao estresse são regulados pelos fatores de transcrição Msn2p e Msn4p (GASH, 2000). Além disto, já foi sugerido que a regulação de alguns genes induzidos pelo tratamento de 200 MPa por 30 min, está sob o controle dos fatores transcricionais Msn2p e Msn4p. Outros piezotratamentos também demonstraram a indução de genes que são controlados por Msn2/4p confirmando a ativação destes fatores sob estresse de alta pressão hidrostática (FERNANDES et al., 2004; IWAHASHI et al., 2003; IWAHASHI et al., 2005).

Além disso, a investigação do papel de Msn2/4 na indução de tolerância pelo tratamento prévio sub-lethal de 50 MPa, demonstrou que linhagens mutantes de *S. cerevisiae* deletadas no fator de transcrição Msn2/4, foram mais sensíveis ao tratamento posterior de 200 MPa quando comparadas com as linhagens selvagens (DOMITROVIC et al., 2006).

Uma das respostas mais pronunciadas após o tratamento de alta pressão hidrostática corresponde a via de resposta ao estresse oxidativo. Análises de microarranjo demonstraram que 131 genes associado com o estresse oxidativo estão sendo induzidos após o tratamento de 200 MPa por 30 minutos (FERNANDES et al., 2004). Adicionalmente, foi observado uma indução de genes relacionados com a síntese de metionina imediatamente após o tratamento de pressão, sendo que a metionina, tanto livre quanto incorporada nas proteínas, apresenta um importante papel na resposta contra o dano oxidativo. HHP também induz os genes *ZWF1* e *GND2* que codificam enzimas relacionadas com a via das pentoses fosfatos, sendo que esta via possui um

papel fundamental na geração de NADPH, que por sua vez é importante na resposta ao estresse oxidativo, de forma a manter os níveis intracelulares de glutatona reduzida (BRAVIM et al., 2013).

#### 1.6. ESTRESSE OXIDATIVO EM *S. cerevisiae*

Os organismos aeróbicos são constantemente expostos a espécies reativas de oxigênio (ROS), geradas durante o metabolismo normal ou pela exposição a compostos que geram radicais livres. O oxigênio molecular é pouco reativo, mas quando reduzido forma uma série de espécies reativas, incluindo ânion superóxido e peróxido de hidrogênio, que ao reagirem produzem o radical hidroxil altamente reativo. ROS são agentes tóxicos que podem causar danos em uma variedade de componentes celulares resultando em peroxidação lipídica, oxidação de proteínas, além de danos genéticos pela modificação do DNA. O estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e a sua remoção através de sistemas biológicos que as eliminam ou reparam os danos por elas causados (DEMASI et al., 2006; HERRERO et al. 2007).

A respiração mitocondrial (Figura 3) é a principal fonte de espécies reativas nas células eucariontes, através do processo de fosforilação oxidativa. Para gerar ATP, elétrons são transportados ao longo de um complexo de proteínas que constituem a cadeia transportadora de elétrons até oceptor final, o oxigênio molecular, com formação de água, sendo que a mitocôndria produz ânion superóxido pela redução incompleta do oxigênio com elétrons dos componentes iniciais e intermediários da cadeia de transporte de elétrons (MURPHY, 2009).

A resposta de defesa a elevados níveis de ROS é crucial para manter o estado redox da célula e prevenir a morte celular. Um importante fator dessa resposta é a modificação do padrão de expressão gênica que levam a indução de proteínas antioxidantes, e tem sido demonstrado que a resposta antioxidante é controlada principalmente pelo fator de transcrição *YAP1* (Figura 4), que na ausência de agentes oxidantes localiza-se no citoplasma e com o aumento de espécies reativas de oxigênio na célula leva a um acúmulo no núcleo, e resultando em uma indução de diversos genes de resposta ao estresse oxidativo (KUGE et al., 1997).

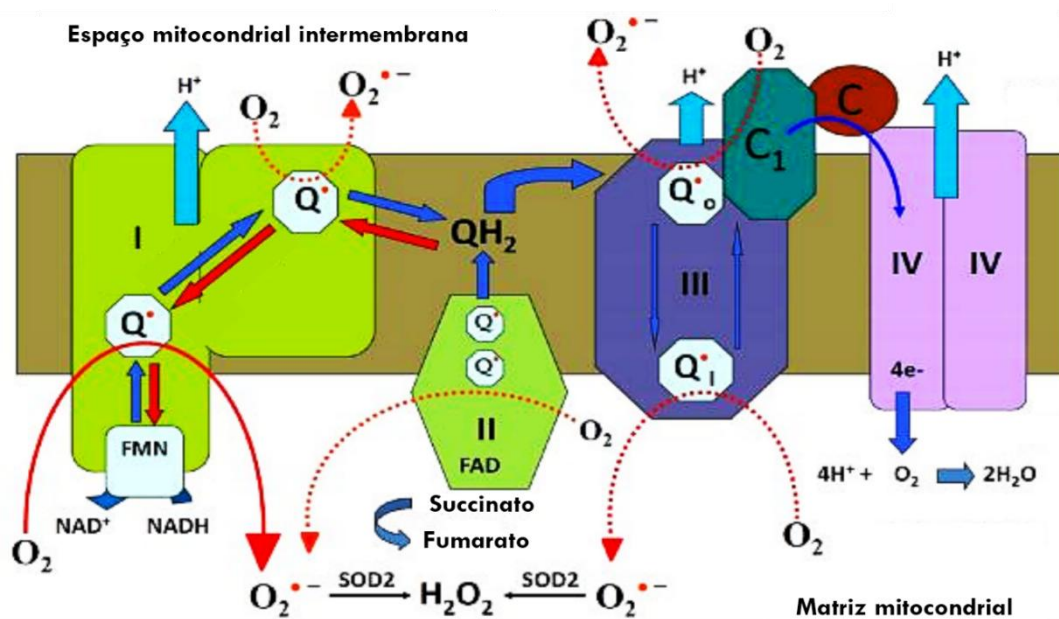


Figura 3: Representação esquemática da cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria e produção de superóxido. Cada complexo da cadeia transportadora de elétrons causa redução do oxigênio molecular a superóxido, retirando elétrons pela oxidação de NADH a NAD<sup>+</sup>, da oxidação de succinato a fumarato e da oxidação da semiquinona (Q<sub>0</sub>).

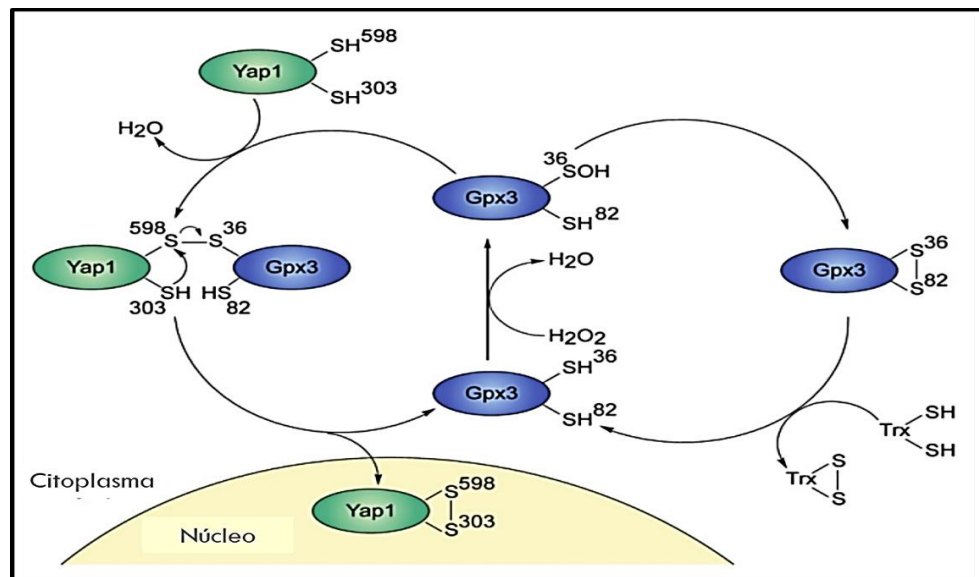


Figura 4: Mecanismo molecular de regulação para o acúmulo do fator de transcrição YAP1 no núcleo. Neste modelo, o sítio ativo de cisteína (Cys36) da peroxirredoxina Gpx3 é oxidado a ácido sulfenico, que pode reagir com outro resíduo de cisteína em GPx3 (Cys82) ou com Yap1 (Cys598). A última via leva ao acúmulo do fator de transcrição Yap1 no núcleo. Modificado de Paulsen e Carroll, 2009.

As defesas antioxidantes incluem enzimas presentes em diferentes compartimentos celulares e são responsáveis por manter o balanço redox da célula. Dentre as quais podemos citar a catalase (Figura 5), sendo que *S. cerevisiae* apresenta duas catalases, a catalase peroxissomal, codificada pelo gene *CTA1*, e a catalase citosólica sintetizada pelo gene *CTT1*. A catalase converte duas moléculas de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em duas de  $\text{H}_2\text{O}$  e uma de  $\text{O}_2$ , e por apresentar íons ferro III ( $\text{Fe}^{3+}$ ) complexados em sua molécula, reduz a primeira molécula de peróxido a água formando um intermediário iônico radicalar através da oxidação do  $\text{Fe}^{3+}$  para  $\text{Fe}^{4+}$  pelo átomo de oxigênio retirado do peróxido. Em seguida, esse intermediário reage com outra molécula de peróxido de hidrogênio, formando água e oxigênio molecular, restaurando a enzima ao seu estado inicial (HERRERO et al., 2007; JAMIESON, 1998).



Figura 5: Reação de redução do peróxido de hidrogênio a água catalisada pela catalase. A enzima causa a redução de uma molécula de peróxido de hidrogênio através da retirada de um átomo de oxigênio, que se complexa com a própria molécula. Em seguida, o átomo de oxigênio complexado na enzima reage com outra molécula de peróxido, promovendo uma segunda redução e restauração da enzima ao seu estado inicial.

Outra enzima muito importante na defesa da célula ao estresse oxidativo é a superóxido dismutase (SOD) que converte o anion superóxido em peróxido de hidrogênio que pode então ser reduzido a água pelas catalases e peroxidases (Figura 6). *S. cerevisiae* apresenta duas SODs que diferem entre si pela sua localização intracelular, uma está localizada no citoplasma e é sintetizada pelo gene *SOD1*, e a outra está localizada na matriz mitocondrial, codificada pelo gene *SOD2* (HERRERO et al., 2007; JAMIESON, 1998).





Figura 6: Reação de conversão do ânion superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) em peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) catalisada pela superóxido dismutase (SOD). A enzima SOD catalisa a conversão do  $\text{O}_2^-$  em  $\text{H}_2\text{O}_2$ , oxidando o íon complexo em sua composição para ceder elétrons ao superóxido.

Resíduos de metionina das proteínas são particularmente susceptíveis à oxidação por ROS, sendo que a oxidação desses resíduos leva a formação de uma mistura racêmica de metionina-S-sulfoxido (Met-S-SO) e metionina-R-sulfoxido (Met-R-SO), e muitos organismos contêm metionina sulfóxido redutase que catalisa a redução do grupo tiol dos resíduos de metionina oxidados. Em *S. cerevisiae*, dois genes são responsáveis pela síntese da metionina sulfóxido redutase, são eles *MXR1* e *MXR2* (HERRERO et al., 2007; LE et al., 2009).

O sistema tioredoxina (TRX) (Figura 7) também constitui uma importante defesa antioxidante. As tioredoxinas são polipeptídeos que contêm dois resíduos de cisteína, estes reduzem grupos dissulfetos a tióis, doando elétrons aos átomos de enxofres de cisteína. TRX opera com o NADPH e a tioredoxina redutase, formando um sistema redutor eficiente que, em cooperação com Trx peroxidases promove a remoção do  $\text{H}_2\text{O}_2$  intracelular. *S. cerevisiae* contém duas Trx citosólica (Trx1 e Trx2) e uma mitocondrial (Trx3). Além disso, apresentam duas Trx redutase uma citosólica e mitocondrial, Trx1 e Trx2 respectivamente (DEMASI et al., 2005).

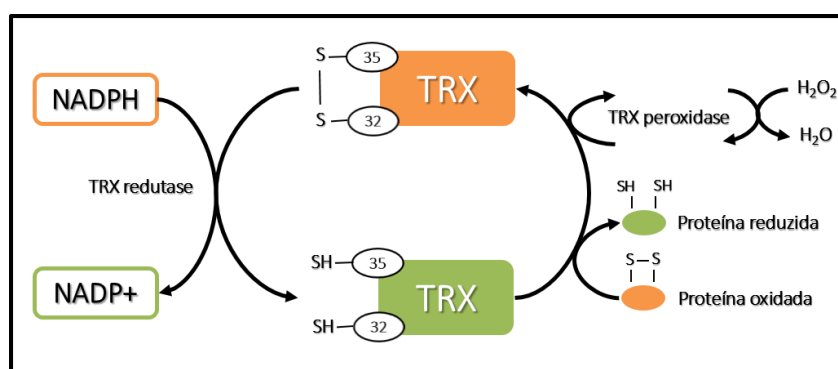


Figura 7: Sistema Tiorredoxina (TRX). TRX opera com o NADPH e a tioredoxina redutase que em cooperação com Trx peroxidases promove a remoção do  $\text{H}_2\text{O}_2$  intracelular

O sistema da glutathiona (Figura 8) é considerada uma das mais importantes defesas antioxidante da célula, sendo crucial nas reações de detoxificação. A glutathiona (GSH) é um tripeptídeo formado pelas moléculas de cisteína, glutamina e glicina. Devido a presença do resíduo de cisteína, a glutathiona possui um grupo tiol em sua molécula que é facilmente oxidado. A glutathiona peroxidase catalisa a oxidação de duas moléculas de glutathiona reduzida (GSH) para uma molécula oxidada (GSSG), formando uma ligação dissulfeto entre as duas moléculas de GSH, reduzindo o peróxido de hidrogênio à água pela transferência de elétrons da glutathiona. Para que a atividade protetora da glutathiona expressa pela redução de espécies oxidantes, tendo como consequência a oxidação da GSH à glutathiona dissulfeto (GSSG) seja mantida, a GSH precisa ser regenerada pela ação da glutathiona redutase. A glutathiona redutase converte a molécula de GSSG em duas de GSH, oxidando NADPH em  $\text{NADP}^+$ , com rompimento da ligação dissulfeto da GSSG e restauração dos grupos tióis reduzidos do GSH, restabelecendo a capacidade antioxidante do sistema (JAMIESON, 1998).

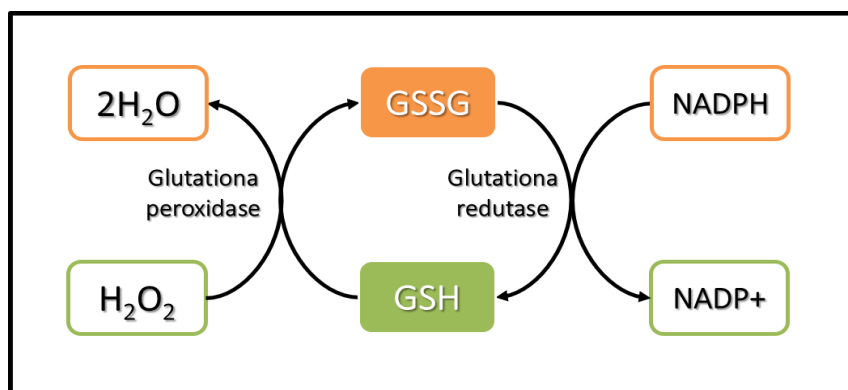


Figura 8: Reação de redução do peróxido a água pela glutathiona reduzida (GSH). A glutathiona peroxidase catalisa a redução de peróxido de hidrogênio a água através da oxidação de duas moléculas de GSH para uma glutathiona oxidada (GSSG). A glutathiona redutase reduz uma molécula de GSSG para duas GSH, através da oxidação de uma molécula de NADPH para  $\text{NADP}^+$ .

Considerando que para um aumento na produtividade industrial exige uma demanda de linhagens de leveduras adaptadas a múltiplos estresses encontrados durante o processo fermentativo. Sabe-se que a alta pressão hidrostática, corresponde a um estresse que influencia diversos processos fisiológicos e bioquímicos em *S. cerevisiae*, sendo que a levedura responde ao piezotratamento induzindo a expressão de vários genes de defesa, confirmando a alta pressão hidrostática como uma

importante ferramenta biotecnológica para compreensão da resposta da levedura ao estresse, facilitando a seleção de linhagens de leveduras resistentes ao estresse e com alta produtividade.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Compreender a resposta à alta pressão hidrostática da célula de *Saccharomyces cerevisiae* com enfoque na via de resposta estresse oxidativo.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Submeter as células de levedura ao tratamento de alta pressão hidrostática;
- Avaliar o acúmulo de espécies reativas de oxigênio em células após o piezotratamento;
- Submeter as células de levedura aos tratamentos de etanol, de temperatura e pressão osmótica e avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio após os tratamentos;
- Confirmar a expressão de genes relacionados à resposta ao estresse oxidativo após piezotratamento;
- Analisar o acúmulo de espécies reativas em célula de levedura superexpressando *STF2* (pSTF2) após o tratamento de alta pressão hidrostática.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1. MICRORGANISMO E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

A linhagem da levedura *S. cerevisiae* (BT0510) utilizada no presente estudo foi previamente isolada de destilaria do estado do Espírito Santo e identificada por testes bioquímicos e análises moleculares (BRAVIM, 2011). Esta consiste em uma linhagem haploide, com capacidade de floculação e apresenta uma alta eficiência fermentativa.

Após a seleção da linhagem, as células de levedura foram cultivadas em meio YEPD (2% (p/v) de glicose, 2% (p/v) de peptona, e 1% (p/v) de extrato de levedura), incubadas a 28 °C e 150 rpm de agitação até a fase logarítmica de crescimento (cerca de 14 horas), para os experimentos com estresse térmico, osmótico e de etanol (item 3.2), pressão hidrostática (item 3.3) e posterior avaliação por citometria de fluxo (item 3.5).

Também foi utilizado para a realização deste trabalho a linhagem geneticamente modificada BT0510-pSTF2 (BRAVIM, 2013), cultivada em YEPD líquido com geneticina G418 (100 µg/mL) até a fase logarítmica de crescimento e posteriormente foi submetida ao tratamento de alta pressão hidrostática (item 3.3) para avaliação do acúmulo de espécies reativas de oxigênio por citometria de fluxo (item 3.5).

#### 3.2. TRATAMENTOS

##### 3.2.1. Estresse térmico, osmótico e de etanol

As células foram crescidas a 28 °C com agitação em meio YEPD líquido até a fase logarítmica de crescimento, como descrita no item 3.1, antes de serem submetidas aos tratamentos subletais de etanol, temperatura e osmolaridade. Para o tratamento com etanol, as células foram incubadas em YEPD líquido suplementado com 8% (v/v) de etanol por 30 min a 28 °C a 160 rpm. O tratamento com temperatura foi feito com a incubação das células em YEPD a 37 °C por 30 min sob agitação. Para o estresse osmótico, as células foram incubadas em YEPD líquido contendo 1 molar (M) de

sorbitol. Os tratamentos foram realizados nos tempos de 30 e 60 minutos. Realizados os tratamentos, procedeu-se com a análise de viabilidade e acúmulo de espécies reativas por citometria de fluxo (item 3.5).

### **3.2.2. Alta pressão hidrostática**

No tratamento com alta pressão hidrostática, a suspensão celular foi colocada em um tubo de Teflon hermeticamente fechado e alojado no interior do cilindro de pistão de Cobre-Berílio (célula de pressão). A pressão foi alcançada por compressão do tubo de Teflon na célula de pressão, através de uma prensa hidráulica operada manualmente (Eureka, MG, Brasil). A pressão celular interna foi medida com um manômetro mecânico calibrado (Woler, Brasileira, MG, Brasil).

O aparato para aplicação de alta pressão hidrostática utilizado no presente trabalho é uma adaptação de uma célula de pressão fabricada em aço de alta dureza desenvolvida por E. S. Itskerich, em 1962, no “Institute for High Pressure Physics of the Russia Academy of Science”. Esta célula foi desenhada para pressurização de amostras em um meio fluido através de um pistão de um cilindro de aço. A vantagem desta montagem é que após a pressurização, um conjunto de engrenagens mantém a pressão aplicada e a unidade pode ser removida.

As células de levedura BT0510 foram submetidas aos seguintes tratamentos: (1) 50 MPa por 30 minutos a temperatura ambiente e (2) 50 MPa por 30 minutos seguida por incubação a pressão e temperatura ambiente por 15 minutos. Após os tratamentos procedeu-se com a análise de citometria de fluxo (item 3.4) e expressão gênica (item 3.5).

A linhagem modificada BT0510-pSTF2 foi submetida apenas ao tratamento de 50 MPa por 30 minutos.

## **3.3. ANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO**

As análises de citometria de fluxo foram realizadas em um Attune® Acoustic Focusing Cytometer (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA) equipado com dois lasers de excitação, um na faixa do azul de 20 mW (488 nm) e um na faixa do violeta de 50 mW (405 nm), ambos com três canais de detecção.

Primeiramente, a amostra contendo as células de levedura foi levada ao citômetro sendo aspirada no equipamento, e então esta suspensão de células foi conduzida por um fluxo contínuo de solução salina que conduziu as células uma a uma até a interceptação do feixe luminoso do laser. Posteriormente, a população de leveduras de interesse foi selecionada dentre todos eventos detectados pelo equipamento através do dot plot gerado pela leitura no citômetro, este que corresponde a um gráfico de dois eixos onde cada evento lido é representado por um ponto

Neste gráfico, as células foram distribuídas conforme o forward scatter (FSC) e o side scatter (SSC). Esses parâmetros são determinados pelo ângulo de espalhamento do laser. O FSC corresponde a espalhamentos da luz em pequenos ângulos, a luz ao ser refratada para a frente é proporcional ao tamanho relativo da célula. Já o SSC, corresponde a espalhamentos da luz em ângulos maiores, fornecendo dados proporcionais à granulosidade e complexidade das células de leveduras analisadas.

As voltagens FSC e SSC foram ajustadas até a detecção da população de levedura analisada. Após realizar a leitura, selecionou-se manualmente a população formada através da ferramenta “*gate*” do software. Utilizando o software do equipamento, gerou-se então histogramas da intensidade de fluorescência a partir do *gate* construído. Dessa forma, as análises de viabilidade e acúmulo de espécies reativas de oxigênio foram feitas a partir do *gate* da população de interesse.

### **3.3.1. Viabilidade**

A análise da viabilidade celular por citometria de fluxo foi realizada utilizando o kit LIVE/DEAD® FungaLight™ Yeast Viability (Invitrogen Molecular Probes, Eugene, OR, EUA). O kit é composto por dois fluoróforos, SYTO9 e Iodeto de Propídio (PI). O SYTO 9 consiste em uma sonda fluorescente de ácido nucleico que se difunde em membranas tanto de células vivas quanto de células mortas e o Iodeto de Propídio,

um corante fluorescente que também intercala em ácidos nucleicos se difundindo apenas em células com a membrana danificada.

Para a análise, coletou-se uma alíquota de 1 mL da amostra em um microtubo. A alíquota foi lavada em tampão Tris 50 mM (pH 7,2), centrifugada a 10.000 rpm por 2 minutos e ressuspendida em tampão para concentração final de células de  $1 \times 10^6$  células/mL.

Posteriormente foi adicionado 1  $\mu$ L de SYTO 9 e 1  $\mu$ L de PI ao microtubo. Após a adição dos corantes, a amostra foi incubada no escuro a 30 °C por 15 minutos para posterior leitura. Para a leitura das amostras o equipamento foi configurado para emitir o laser azul (488 nm) e coletar a fluorescência através dos detectores BL1 (530/3bb0 nm) e BL3 (640 nm).

Para análise de viabilidade foi realizado o controle positivo, em que as células de levedura foram submetidas à temperatura de 80 °C por 10 min.

### **3.3.2. Acumulo de espécies reativas**

A avaliação do estado redox da célula por citometria de fluxo foi feito pelo uso da sonda fluorescente CM-H<sub>2</sub>DCFDA (Life Technologies, Eugene, Oregon, EUA). O corante ao se difundir para o interior da célula, é clivado por esterases intracelulares nas duas ligações éster, formando um produto impermeável à membrana da célula. Essa molécula não fluorescente se acumula intracelularmente e a sua subsequente oxidação proporciona a formação de um produto altamente fluorescente. Assim o estado redox da célula pode ser monitorado pela detecção do aumento da fluorescência por citometria de fluxo ou microscopia de fluorescência.

Primeiramente, CM-H<sub>2</sub>DCFDA foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) para preparo de uma solução estoque de 10 mM e, então, diluiu-se o corante em PBS formando uma solução de 1 mM.

Para a análise, coletou-se uma alíquota de 1 mL da amostra em um microtubo. A alíquota foi lavada em tampão fosfato salino (PBS), centrifugada a 10.000 rpm por 2 minutos e ressuspendida para uma concentração final de células de  $1 \times 10^6$  células/mL.



Posteriormente, foi adicionado 10 µL do corante ao microtubo com a amostra previamente lavada e diluída. Após a adição do corante, a amostra foi incubada no escuro a 30 °C por 30 minutos para posterior leitura. A leitura foi conduzida no equipamento configurado para emitir o laser azul (488nm) e coletar a fluorescência através do detector BL1 (530 nm).

Para avaliação do acúmulo de espécies reativas foi feito o controle positivo, onde as células de levedura foram mantidas à 15 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 60 minutos.

### 3.4. EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-PCR EM TEMPO REAL

Para confirmar a indução de alguns genes relacionados com a resposta da célula ao estresse oxidativo após o tratamento de pressão hidrostática, foi realizada análise de RT-PCR em tempo real (qRT-PCR). Os genes escolhidos, bem como a sequência e o tamanho de cada fragmento estão descritos na Tabela 1. O gene ALG9 foi utilizado como gene de referência (TESTE *et al.*, 2009).

Após os tratamentos de pressão (item 3.3) as células foram imediatamente colocadas no gelo. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 5000 g por 3 min à 4 °C, lavadas com água ultrapura e centrifugadas novamente, sendo o precipitado imediatamente congelado em N<sub>2</sub> líquido e mantido a -80 °C até o momento da extração de RNA.

Para extração de RNA as células foram ressuspensas em tampão AE (50 mM de acetato de sódio, 10 mM de EDTA, pH 5,3) e 10% de SDS. A extração prosseguiu com fenol/clorofórmio e a amostra foi precipitada com 3 M de acetato de sódio e etanol absoluto. Após a extração, seguiu-se a lavagem do RNA com etanol 70% e ressuspensão com água ultrapura.

A qualidade e quantidade de RNA foi determinada usando o espectrofotômetro Nanodrop® 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Carlsbad, EUA). Uma alíquota de 1 µl de RNA foi submetida às leituras nos comprimentos de onda de 260 nm e varredura de 220 nm. Os resultados foram avaliados no programa Nanodrop® 2000.

Para a remoção de qualquer resíduo de DNA genômico, 1 µg de RNA total foi tratado com o kit DNase RQ1 (PROMEGA, Madison, EUA) durante 30 min a 37 °C. Para

inativação da enzima adicionou-se à amostra 1 µl de stop solution (20mM de EDTA) por 10 min à 65 °C.

Após tratamento com a DNase, prosseguiu-se com a confecção da fita de cDNA utilizando o kit “High Capacity cDNA Reverse Transcription” (Applied Biosystems, Califórnia, EUA). Para isso, utilizou-se 2 µl de tampão da RT (10x), 0,8 µL de 25x mistura de dNTP (100mM), 2 µL de primer randômico (10x) e 1 µL da enzima MultiScribe Reverse Transcriptase. As amostras foram incubadas na seguinte ordem: 10 minutos a 25 °C, 50 °C por 50 minutos e, posteriormente, 85 °C por 5 minutos.

Para a reação do PCR em tempo real utilizou-se o equipamento Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR (Life Technologies, Carlsbad, EUA). O volume total de reação foi de 20 µl contendo: 1,0 µl de cDNA, 10 µl do kit SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Califórnia, EUA), 1,0 µl de cada primer a uma concentração de 10 µM. As amostras foram submetidas a um ciclo de 95 °C por 10 minutos, 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto, finalizando-se por um ciclo de 95 °C por 15 segundos.

A análise dos dados gerados foi feita com o auxílio do software SDS Software System (7500 version 2.0.1, Applied Biosystems, Carlsbad, EUA). Por meio deste software determinou-se o *threshold*, ou limiar de detecção, de cada amostra testada. O *threshold* corresponde a um ponto de referência, uma vez que neste ponto todas as amostras possuem a mesma intensidade de fluorescência. Uma vez determinado o *threshold*, foi estabelecido o número de Ct (do inglês *threshold cycle*) de cada amostra. O número de Ct serve como base de comparação entre as amostras, pois se refere ao número de ciclo no qual a curva de amplificação de cada amostra atinge o *threshold* estabelecido.

A eficiência de cada par de primer (Tabela 1) foi avaliada pelo método de diluição seriada usando um mix de DNA como padrão. O valor de eficiência foi calculado pela seguinte fórmula:  $E = [10^{(-1/a)}]$ , onde “a” é o *slope* entre cada concentração conhecida de cDNA utilizada na curva padrão (primer com eficiência de 100% apresentam *slope* de -3,32). Valores de eficiência entre 90 e 110% foram considerados, utilizando-se a seguinte fórmula para o cálculo da expressão relativa,  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , onde  $\Delta\Delta CT = [(CT_{Tratado} - CT_{Controle}) - (CT_{Tratado-Referência} - CT_{Controle-Referência})]$ .

Tabela 1: Oligonucleotídeos utilizados como primers na reação de qRT-PCR

Gene	Sequência do primer	Tamanho do amplicon (pb)	Eficiência do primer (%)
<b>CTT1</b>	Foward: ACGGCCCTATCTTACTGAA	79	95
	Reverse: TACACGCTCCGGAAGTCTTT		
<b>SOD2</b>	Foward: AACCAGGATACCGTCACAGG	130	97
	Reverse: TTCCAGTTGACCACATTCCA		
<b>STF2</b>	Foward: CGGTGAATCTCCAAATCACA	108	96
	Reverse: CACTGGGGGTATTTACCAT		
<b>ZWF1</b>	Foward: TACGCAGAGAATGGCATC	57	102
	Reverse: GTGGCCGAAAGGTTTCTCT		
<b>MXR1</b>	Foward: TGGATTGTTGCTCATTCA	123	96
	Reverse: CCATTTTGGTTGCCATTCT		
<b>MXR2</b>	Foward: ACGAGTCCGGTGTCTACCA	105	98
	Reverse: CCAGGGGATACCTCTTCGT		
<b>ALG9*</b>	Foward: ACATCGTCGCCCCAATAAAT	145	92
	Reverse: GATTGGCTCCGGTACGTAAA		

\* Gene de referência

### 3.5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os gráficos foram feitos no software *Graph Pad Prism* (versão 5.0, Graph Pad, Califórnia, EUA) com utilização de média e desvio padrão para as barras e o cálculo dos erros, e todos os experimentos foram feitos em triplicata, exceto a análise da

expressão gênica, que foi feita em duplicata. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e suas médias foram comparadas pelo teste de Tukey com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. ACÚMULO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO APÓS O PIEZOTRATAMENTO

Visando observar o acúmulo de espécies reativas causado pela alta pressão hidrostática em *S. cerevisiae*, células da linhagem BT0510 foram crescidas até a fase exponencial de crescimento ( $D.O_{600nm}=1,0$ ) e submetidas ao tratamento de 50 MPa por 30 min. Após o tratamento de pressão prosseguiu-se com a investigação do estado redox da célula (Figura 9) utilizando a sonda fluorescente CM-H<sub>2</sub>DCFDA, que ao se difundir para o interior da célula, é clivado por esterases intracelulares, formando um produto impermeável à membrana da célula. Essa molécula não fluorescente se acumula intracelularmente e a sua subsequente oxidação proporciona a de um composto altamente fluorescente. Assim o estado redox da célula pode ser monitorado pela detecção do aumento da fluorescência por citometria de fluxo. Portanto pelas características da sonda fluorescente utilizada, podemos inferir que quanto maior a intensidade de fluorescência, maior é o acúmulo de espécies reativas na célula.

Células submetidas ao tratamento de 50 MPa apresentaram uma maior intensidade de fluorescência quando comparadas com o controle negativo ( $p<0,05$ ), que correspondem as células mantidas à pressão ambiente de 0,1 MPa (Figura 10). Sendo assim, o tratamento de alta pressão hidrostática promove um acúmulo de espécies reativas na célula. Outros trabalhos já sugeriram que a alta pressão hidrostática promove estresse oxidativo nas células, visto que diversos genes relacionados com a resposta ao dano oxidativo são expressos após o tratamento por HHP, tais como catalase (*CTT1*), superóxido dismutase mitocondrial (*SOD2*) e a isoforma mitocondrial da tioredoxina peroxidase (*PRX1*) (BRAVIM et al., 2013; FERNANDES et al., 2004). E os resultados do presente trabalho confirmam que o piezotratamento desencadeia um estresse oxidativo nas células.

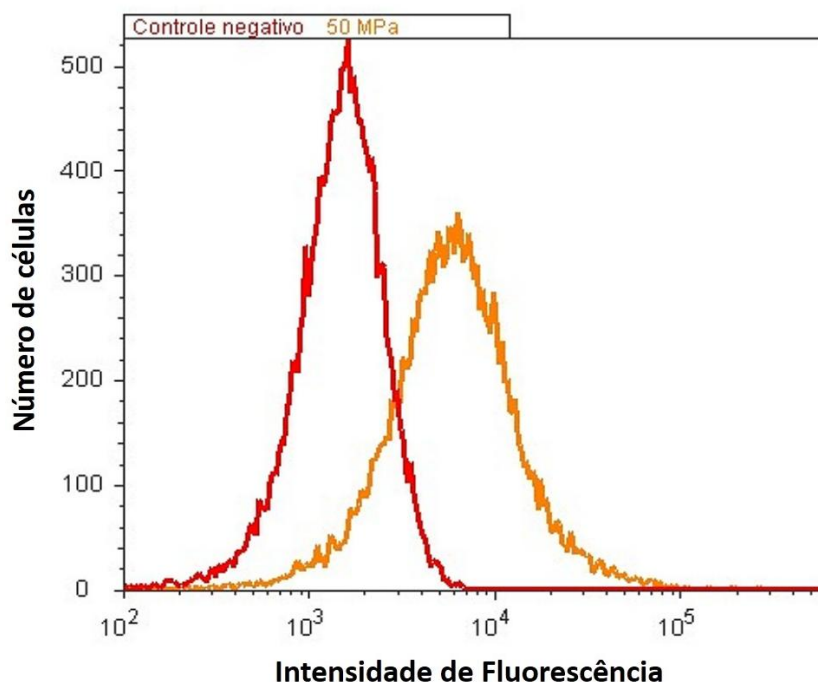


Figura 9: Histograma da intensidade de fluorescência emitida pelo corante CM-H<sub>2</sub>DCFDA em células de *S. cerevisiae* submetida ao tratamento de 50 MPa por 30 min. Controle negativo, que correspondem as células mantidas a pressão atmosférica, 0,1 MPa (vermelho), e as células submetidas à 50 MPa (laranja). Os experimentos foram realizados em triplicata, mas somente uma está representada.

Outros trabalhos reforçam a importância dos mecanismos de defesa ao dano oxidativo para reduzir os efeitos provocados pela alta pressão hidrostática. Já foi observado que células de *S. cerevisiae* crescidas em meio contendo glutatona foram protegidas dos efeitos deletérios do piezotratamento (PALHANO et al., 2004b). Estudo com *Escherichia coli* também destaca que a defesa ao estresse oxidativo tem um importante papel na sobrevivência das células mediante tratamento de pressão, pois as células pressurizadas quando incubadas em meio anaeróbico foram mais resistentes ao tratamento de 400 MPa por 15 min, quando comparadas com células crescidas em meio aeróbico. Além disso, mutantes afetados em genes de resposta ao estresse oxidativo, mostraram-se mais susceptíveis do que as cepas parentais (AERTSEN et al., 2005).

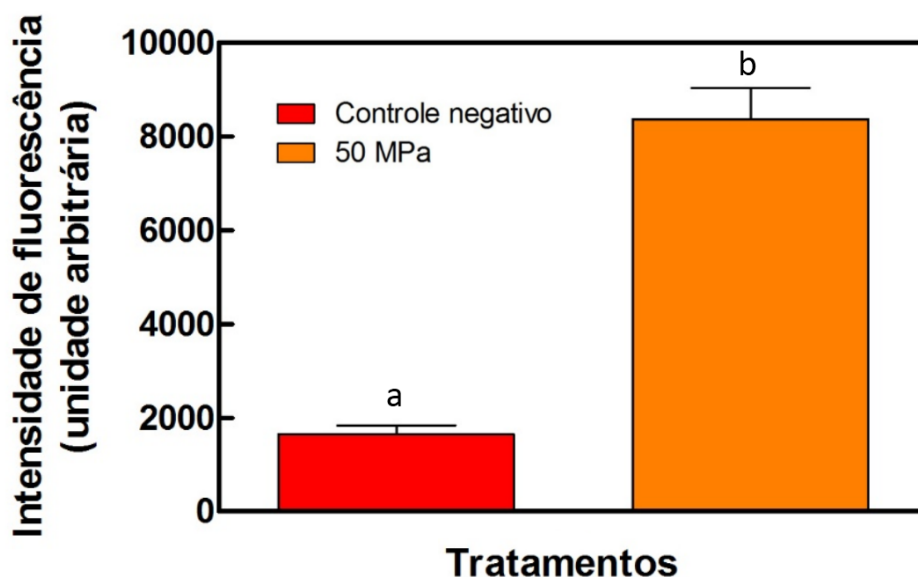


Figura 10: Representação do acúmulo de espécies reativas em células de *S. cerevisiae* submetidas ao tratamento de 50 MPa por 30 min. Controle negativo, que correspondem as células mantidas a pressão atmosférica, 0,1 MPa (vermelho), e as células submetidas à 50 MPa (laranja). As leveduras foram crescidas até a fase exponencial de crescimento antes de serem submetidas ao tratamento de estresse. O experimento foi realizado em triplicata (letras diferentes significam que há diferença significativa entre o controle e o tratamento ( $p < 0,05$ )).

O estresse oxidativo promovido pela alta pressão hidrostática pode estar relacionado com a disfunção da cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria. Sabe-se que as mitocôndrias constituem uma importante fonte de espécies reativas de oxigênio, e perturbações que afetam sua atividade metabólica pode promover um maior acúmulo de ROS na célula. Tem sido observado que a alta pressão hidrostática promove um mal funcionamento da atividade mitocondrial em *S. cerevisiae*, visto que um grande número de genes relacionados à respiração se mostraram reprimidos após o piezotratamento, como por exemplo FLX1, proteína carreadora de FAD mitocondrial; YDJ1 proteína transportadora mitocondrial, PET130, biossíntese de proteínas mitocondriais e AAT1, aspartato transaminase mitocondrial (FERNANDES et al., 2004, RAY et al., 2014).

Além disso, recentemente foi demonstrado que o dano mitocondrial leva ao aumento na geração de espécies reativas em células de leveduras a partir da superfície do retículo endoplasmático (LEADSHAM et al., 2013). Sabe-se que a alta pressão hidrostática induz alterações nas membranas celulares, incluindo a membrana do retículo endoplasmático, alterando portanto sua atividade metabólica (BRAVIM et al., 2010b). Essas observações sugerem que o retículo endoplasmática pode influenciar

no acúmulo de espécies reativas em células de *S. cerevisiae* submetidas ao tratamento de alta pressão hidrostática.

Adicionalmente, os genes relacionados com a lançadeira glicerol-3-fosfato estão altamente induzidos após o piezotratamento (BRAVIM et al., 2013). A lançadeira é constituída por duas isoenzimas, a glicerol desidrogenase citosólica codificada pelo gene *GPD1*, e pela glicerol-3-fosfato desidrogenase mitocondrial codificada pelo gene *GUT2*. Sendo que, a lançadeira glicerol-3-fosfato contribui muito para a geração de espécies reativas de oxigênio, pois a mesma transfere equivalentes redutores do citosol para a mitocôndria para a redução da ubiquinona a ubiquinol utilizado na cadeia transportadora de elétrons (Figura 11) (LARSSON et al., 1998).

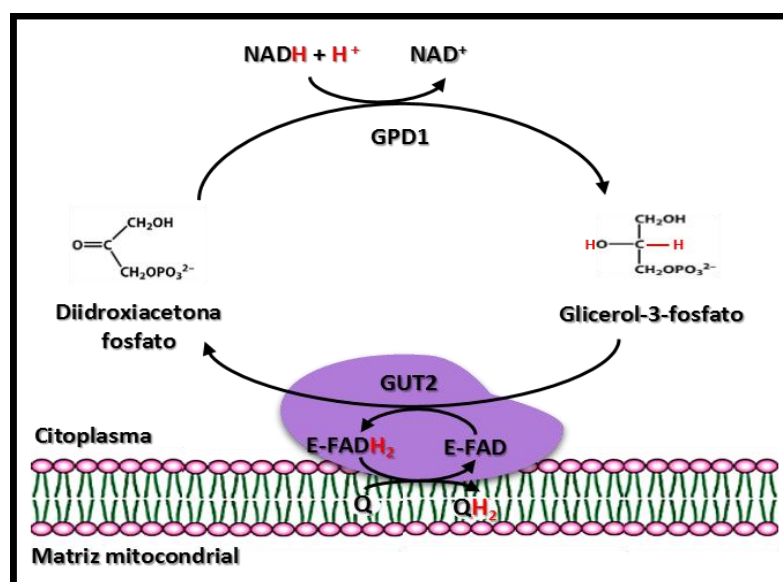


Figura 11: Representação esquemática da lançadeira glicerol-3-fosfato. O NADH produzido na glicólise, não pode ser utilizado diretamente pela cadeia transportadora de elétrons para a formação de ATP. Como a geração de NADH ocorre no citosol e a membrana mitocondrial é impermeável, é possível transportar os elétrons do NADH para a mitocôndria pelo circuito glicerol-3-fosfato. A enzima glicerol-3-fosfato desidrogenase citoplasmática (GPD1) catalisa a redução de diidroxiacetona fosfato utilizando o poder redutor do NADH. O glicerol-3-fosfato difunde-se até a face externa da membrana mitocondrial onde localiza-se a glicerol-3-fosfato desidrogenase mitocondrial (GUT2). A diidroxiacetona fosfato é regenerada formando FADH<sub>2</sub>, que por sua vez entrega seus elétrons à coenzima Q para seguir a sequência da cadeia transportadora de elétron.

#### 4.2. COMPARAÇÃO DO PIEZOTRATAMENTO COM OS OUTROS ESTRESSES

Com o objetivo de comparar o acúmulo de espécies reativas em *S. cerevisiae* submetidas ao piezotratamento as células foram submetidas a diferentes condições



de estresse. Os estresses testados foram: 37 °C por 30 min 8% de etanol por 30 min e 1M de sorbitol também por 30 min. Estes estresses foram escolhidos por serem estresses comuns a processos industriais de fermentação. As análises por citometria de fluxo demonstraram que a intensidade de fluorescência das células submetidas ao tratamento de pressão é maior quando comparado com os outros estresses (Figura 12).

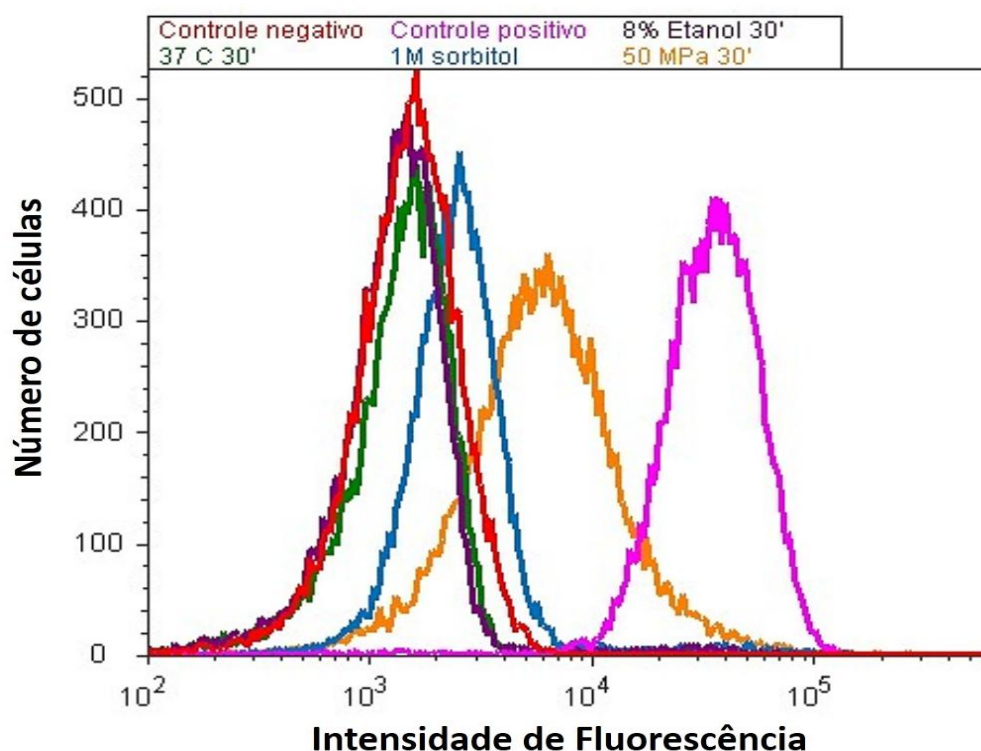


Figura 12: Histograma da intensidade de fluorescência emitida pelo corante CM-H<sub>2</sub>DCFDA em células de *S. cerevisiae* submetida a diferentes tratamentos por 30 min. Controle negativo, que correspondem as células mantidas a pressão atmosférica (vermelho), 37 °C (verde), 8% (v/v) de etanol (roxo), 1 M de sorbitol (azul), 50 MPa (laranja), estes tratamentos foram conduzidos no tempo de 30 minutos e o controle positivo (rosa), refere-se às células submetidas ao tratamento de 15 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 60 minutos. O experimento foi realizado em triplicata, mas somente uma replicata está representada.

Os estresses de etanol, temperatura e osmolaridade não promovem acúmulo de espécies reativas na célula, visto que, não observou-se diferença estatística significativa (Tukey,  $p < 0,05$ ) na intensidade de fluorescência, em amostras de células submetidas aos referidos estresses em comparação com o controle (Figura 13), que correspondem ao grupo de células que não foram submetidas a nenhum tipo de estresse. Diferentemente do tratamento com alta pressão hidrostática, onde observou-

se diferença significativa na intensidade de fluorescência quando comparado ao controle.

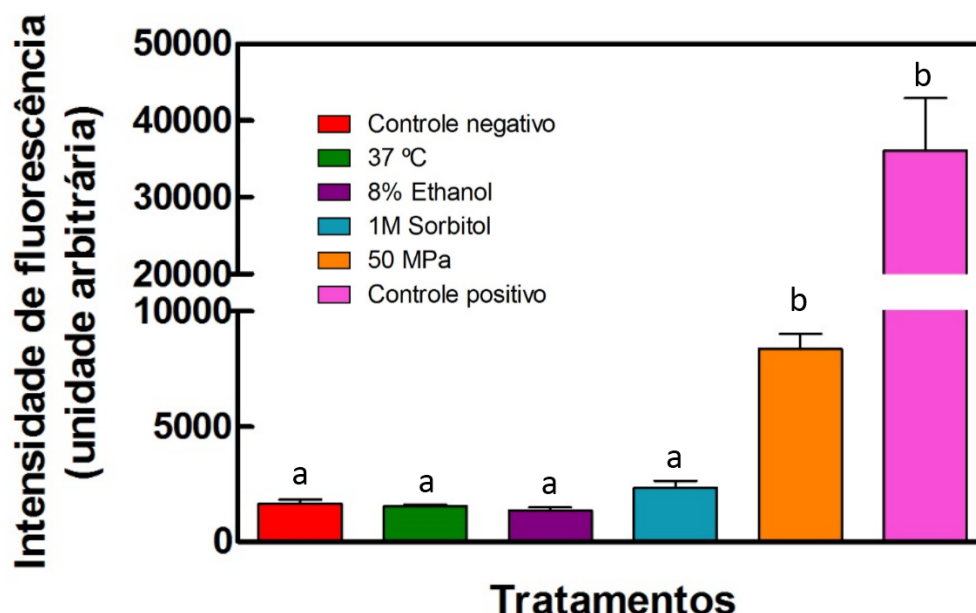


Figura 13: Representação do acúmulo de espécies reativas em células de *S. cerevisiae* sob diferentes estresses por 30 min. Controle negativo, que correspondem as células mantidas a pressão atmosférica (vermelho), 37 °C (verde), 8% (v/v) de etanol (roxo), 1 M de sorbitol (azul), 50 MPa (laranja) e o controle positivo 15 mM por 60 min (rosa) As leveduras foram crescidas até a fase exponencial de crescimento antes de serem submetidas ao tratamento de estresse. O experimento foi realizado em triplicata (letras diferentes significa que existe diferença significativa entre os tratamentos –  $p < 0,05$ ).

Os resultados que comparam o acúmulo de espécies reativas em células de *S. cerevisiae* sob diferentes estresses com o tratamento de alta pressão hidrostática, foram bastante intrigantes, visto que há relatos na literatura que a temperatura, o aumento da pressão osmótica e o estresse de etanol, promove nas células um estresse oxidativo, portanto o resultado esperado seria a observação do aumento da intensidade de fluorescência, e consequentemente aumento do acúmulo de espécies reativas em células submetidas a estes tratamentos, mas como mencionado anteriormente não houve diferença significativa em relação ao grupo controle. Sendo observado aumento da intensidade de fluorescência somente quando as células foram submetidas ao tratamento de 50 MPa por 30 min.

Já foi demonstrado que genes induzidos por etanol estão de uma forma geral envolvidos no metabolismo energético, endereçamento de proteínas, homeostase iônica e resposta ao estresse inclusive resposta ao estresse oxidativo, visto que a exposição celular ao etanol aumenta a atividade da catalase citoplasmática, que é

codificada pelo gene *CTT1* e de *SOD2* (a isoforma mitocondrial da superóxido dismutase). Além disto, o etanol provoca um acúmulo do fator de transcrição Yap1, o principal fator de transcrição que regula a defesa contra danos oxidativos em células de leveduras (ALEXANDRE, et al. 2001; BLEOANCA, et al. 2013). Análises de microarranjo em células de levedura submetidas ao estresse térmico também demonstraram um aumento na indução de genes relacionados com a resposta ao estresse oxidativo, destacando o gene *CTT1*, que codifica a catalase citoplasmática (GASH et al., 2000). Além disso, vários genes que protegem as células do dano oxidativo foram induzidos em resposta ao estresse osmótico, incluindo genes envolvidos no metabolismo redox, na função mitocondrial e biossíntese de compostos antioxidantes, como *CTT1*, *SOD2*, e *TRX2* (GASH et al., 2010; MARTÍNEZ-MONTAÑÉS et al., 2010). Esses dados sugerem portanto, que essas condições adversas podem promover danos oxidativos nas células.

Como mencionado anteriormente, diversos trabalhos sugerem que os estresses ambientais provocam um desequilíbrio no estado redox das células de leveduras, no entanto, tais observações são baseadas em sua maioria em análises de expressão gênica, de modo que variações nas condições ótimas de crescimento deste microrganismo levam a um aumento na síntese de enzimas antioxidantes, no entanto, não há descrição de análises do acúmulo de espécies reativas de oxigênio em células de levedura submetidas a diferentes condições de estresse.

Diante do presente exposto, para melhor compreender as respostas que previnem o acúmulo de espécies reativas na célula induzidas pelos estresses de etanol, temperatura e pressão osmótica, procedeu-se com a análise de viabilidade de maneira a investigar o efeito dos diferentes tratamentos sobre a sobrevivência das células.

Após submeter as células aos tratamentos de 37 °C, 8% de etanol (v/v), 1M de sorbitol e 50 MPa por 30 minutos procedeu-se com aplicação do corante para avaliar a sobrevivência das células mediante as condições citadas.

A análise de viabilidade foi realizada por citometria de fluxo utilizando o kit LIVE/DEAD® que é baseado na permeabilidade da membrana plasmática das leveduras e é composto por dois fluoróforos, sendo que, o SYTO9, um fluoróforo que cora o material genético das leveduras, é permeável tanto em células vivas quanto mortas. O Iodeto de Propídio, por sua vez, é um corante que penetra apenas em

células estressadas as quais apresentem membrana permeabilizada. Portanto as células coradas tanto com o iodeto de propídio quanto com o SYTO9 são tidas como células mortas, ao passo que as células coradas apenas com o SYTO9 representam as células vivas, dessa forma é possível avaliar a sobrevivência das células.

A partir dos dados obtidos pela leitura no citômetro de fluxo, foi construído *dot plots* (Figura 15) separando as populações de células vivas e mortas. O gráfico *dot plot* consiste em um gráfico de dois eixos, onde cada evento lido é representado por um ponto. No caso da análise realizada, no eixo x é observado a intensidade de fluorescência do SYTO9 e no eixo y está representado a intensidade de fluorescência do iodeto de propídio, e essa disposição possibilita separar as populações de células vivas e de células mortas.

Os resultados obtidos pela análise de citometria de fluxo demonstraram que não há diferença significativa (Tukey,  $p < 0,05$ ) na taxa de sobrevivência das células submetidas aos diferentes estresses (Figura 14). Sendo assim, os tratamentos de etanol, temperatura, osmolaridade e alta pressão realizados, exercem efeitos similares na viabilidade de células de levedura.

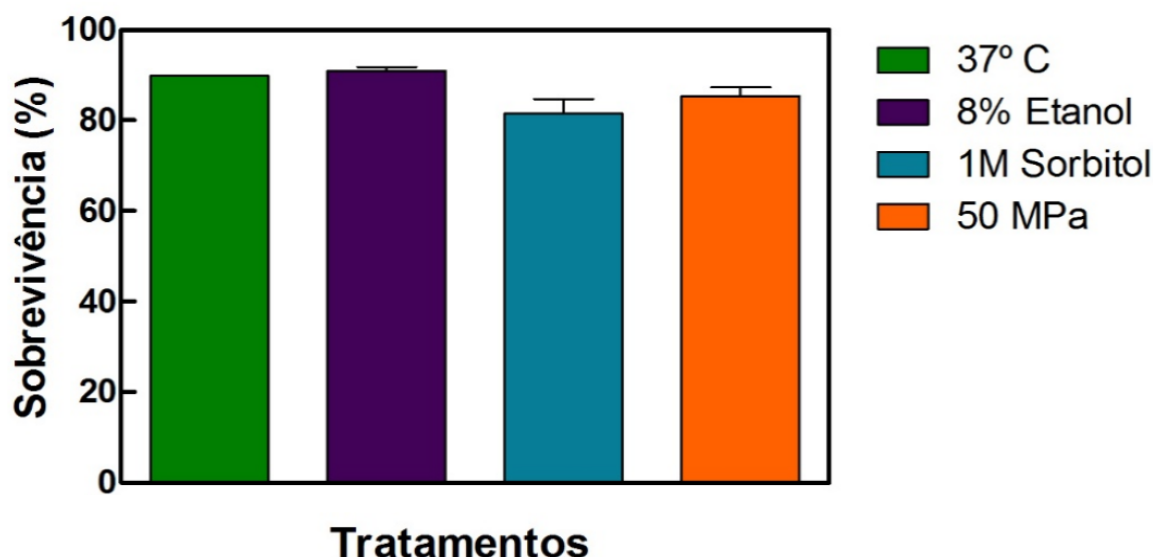
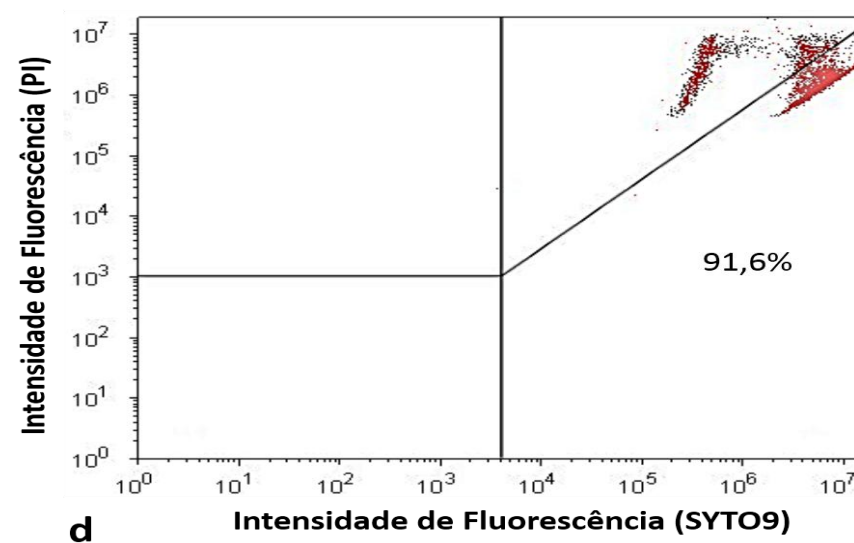
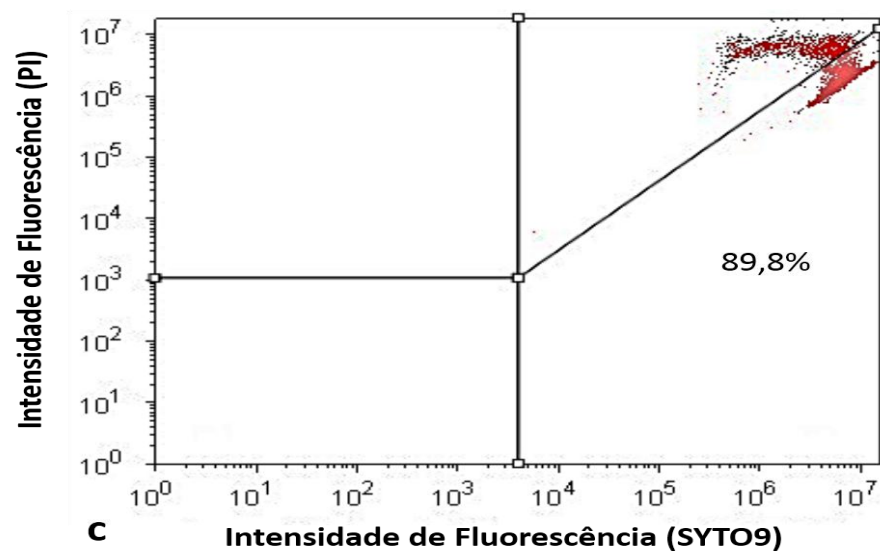
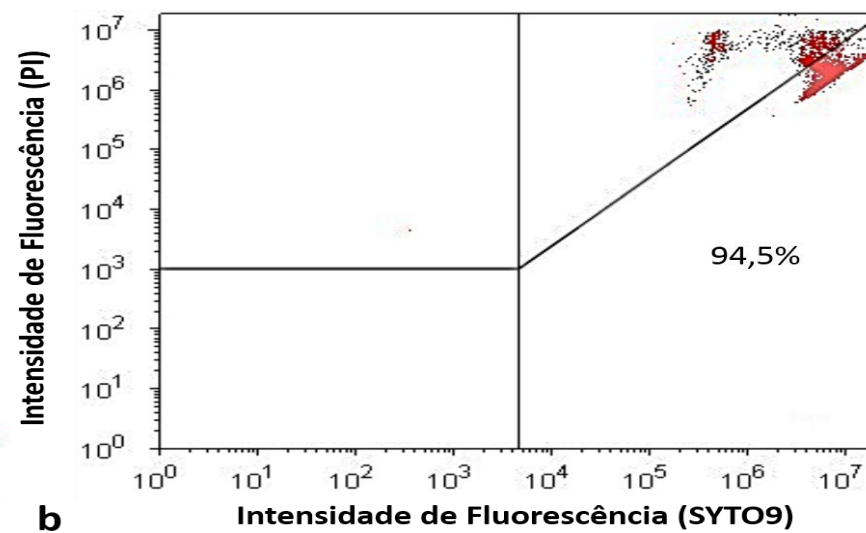
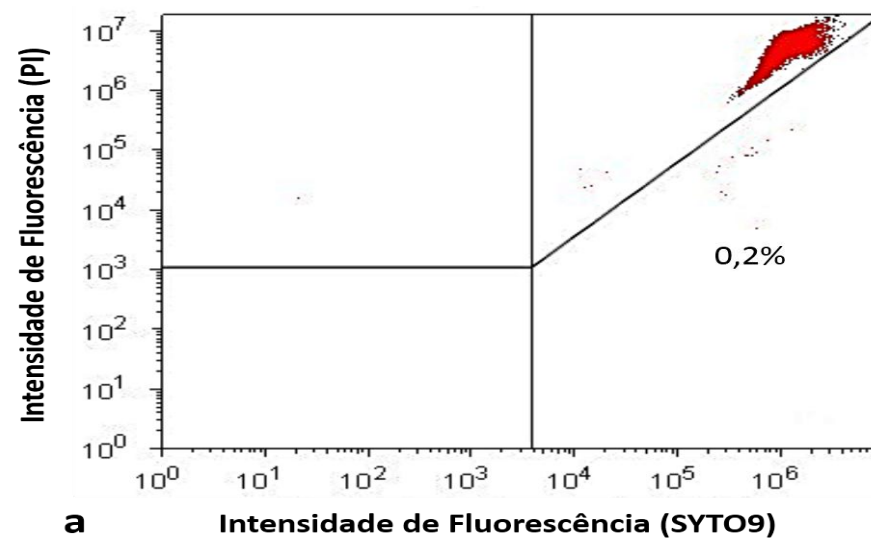


Figura 14: Representação da sobrevivência celular de células de *S. cerevisiae* submetida ao estresse térmico de 37 °C (verde), 8% (v/v) de etanol (roxo), estresse osmótico em meio suplementado com 1 molar de sorbitol (azul), e o tratamento de 50 MPa (laranja) por 30 min. As células das leveduras foram crescidas até a fase exponencial de crescimento e o experimento foi realizado em triplicata (não se observa diferença estatística entre os diferentes tratamentos).



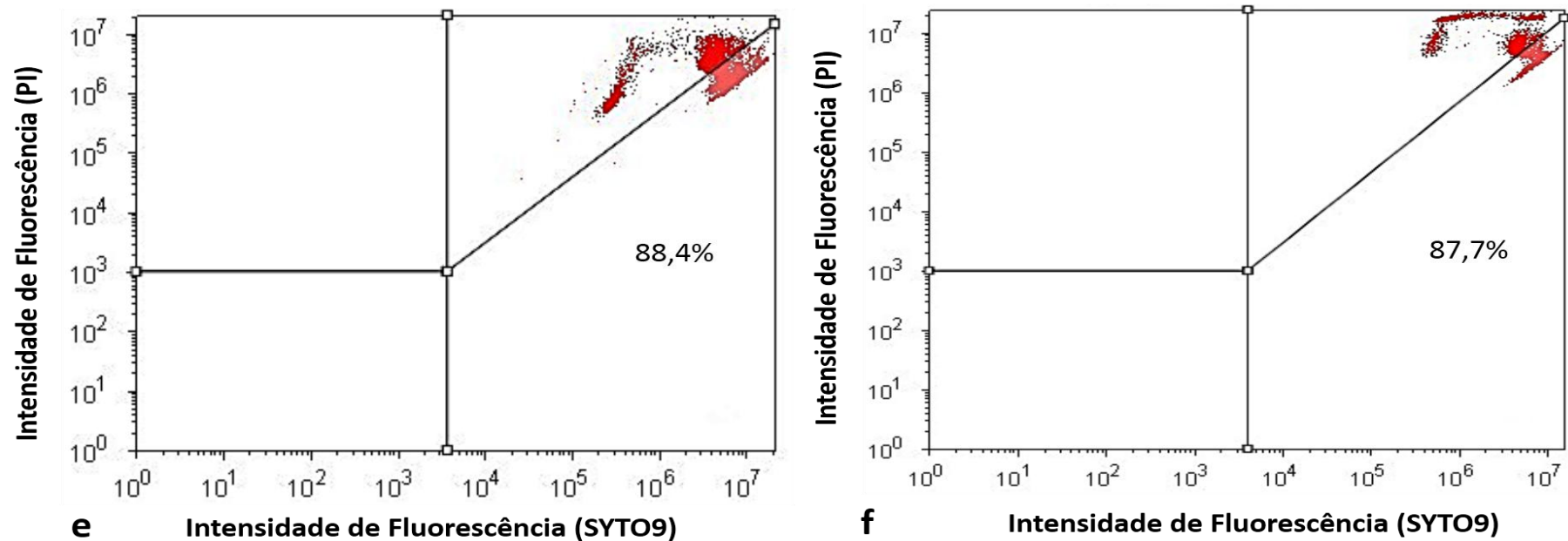


Figura 15: Viabilidade celular de suspensões celulares de leveduras submetidas a diferentes tratamentos a partir da representação por dot plots. Eventos no quadrante superior da direita referem-se a células que coraram com SYTO 9 e com PI, portanto, células mortas. Eventos no quadrante inferior da direita referem-se a eventos que coraram apenas com SYTO 9, células vivas. Os eventos presentes fora dos dois quadrantes foram considerados eventos não corados. Eventos fora desses dois quadrantes foram considerados não corados. (a) Controle positivo, células mantidas a 80°C por 10 min. (b) Controle negativo, amostra contendo células que não foram submetidas a nenhum tratamento. (c) Amostra de células mantidas a 37 °C por 30 min. (d) Células tratadas com 8% de etanol (v/v) por 30 min. (e) Amostra contendo células tratadas com 1M de sorbitol por 30 min. (f) Células submetidas ao tratamento de 50 MPa por 30 min. As análises foram feitas em triplicata. Os resultados de apenas uma replicata estão representados.

Com o objetivo de investigar os efeitos dos estresses térmico, osmótico e etanol no acúmulo de espécies reativas em células de levedura, procedeu-se com a análise da intensidade de fluorescência de CM-H<sub>2</sub>DCFDA em amostras submetidas aos tratamentos de 37 °C, 8% de etanol (v/v), 1M de sorbitol e 50 MPa no tempo de 60 minutos (Figura 16), para avaliar o efeito da maior exposição das células a esses estresses no acúmulo de espécies reativas. Não foi observado diferença significativa ( $p < 0,05$ ) sobre a intensidade de fluorescência das células submetidas aos estresses de temperatura, etanol e osmolaridade por 60 minutos.

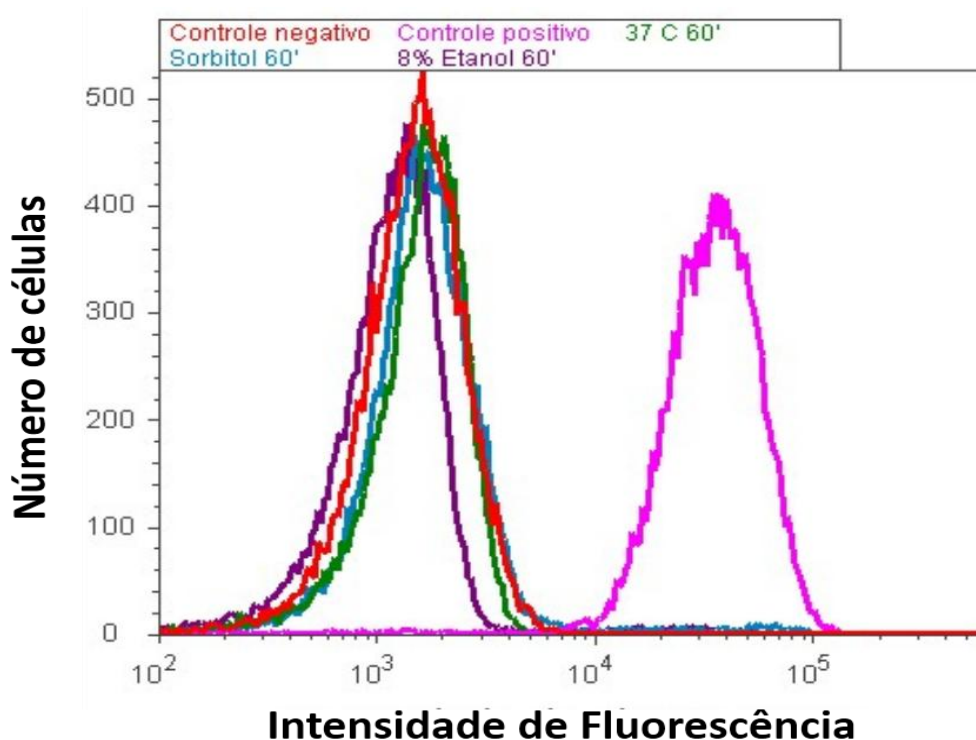


Figura 16: : Histograma da intensidade de fluorescência emitida pelo corante CM-H<sub>2</sub>DCFDA em células de *S. cerevisiae* submetida a diferentes tratamentos por 60 min. Controle negativo, que correspondem as células mantidas a pressão atmosférica (vermelho), 37 °C (verde), 8% (v/v) de etanol (roxo), 1 M de sorbitol (azul), 50 MPa (laranja), estes tratamentos foram conduzidos no tempo de 60 minutos e o controle positivo (rosa), refere-se às células submetidas ao tratamento de 15 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 60 minutos. O experimento foi realizado em triplicata, mas somente uma replicata está representada.

Tem sido demonstrado que os estresses térmico, osmótico e de etanol induzem genes de resposta ao estresse oxidativo (ALEXANDRE et al., 2001; GASH et al., 2000). Sugerindo portanto que os referidos estresses promovem danos oxidativos nas células. No entanto, os resultados obtidos demonstraram que as células submetidas aos tratamentos de 37 °C, 8% de etanol e 1M de sorbitol não apresentaram diferença



na intensidade de fluorescência em relação ao controle, tanto no tratamento por 30 minutos quanto no tratamento realizado no período de 60 minutos.

Essas observações indicam que as condições de injúria mencionadas acima, promovem estresse oxidativo nas células, no entanto imediatamente após serem submetidas a esses estresses as células são capazes de induzir mecanismos de respostas aos danos oxidativos que previnem o acúmulo de espécies reativas nas células, e por consequência não sendo detectado diferença na intensidade de fluorescência nas células submetidas aos tratamentos de temperatura, etanol e pressão osmótica, quando comparadas com a amostra controle.

Dessa forma, a exposição ao etanol, temperatura e osmolaridade induzem nas células respostas antioxidantes imediatamente após o estresse, que previnem o acúmulo de espécies reativas na célula. Ao contrário do tratamento com alta pressão hidrostática que exige das células um curto período de recuperação para induzir mais efetivamente os mecanismos de resposta ao estresse oxidativo, visto que foi observado aumento significativo da intensidade de fluorescência em comparação às células controle (Figura 13).

Já foi observado que a alta pressão hidrostática exige um curto período de incubação à pressão atmosférica após o estresse para induzir respostas de resistência. Adicionalmente, as células sob pressão subletal são capazes de induzir genes responsivos ao estresse, entretanto a tradução desses genes é comprometida devido à inibição do aparato de síntese proteica (PALHANO, et al. 2004; FERNANDES, et al. 2004). Desta forma, a incubação à pressão ambiente possibilita as células responderem e evitar danos provocados pela alta pressão hidrostática.

#### 4.3. ESTRESSE OXIDATIVO APÓS O PIEZOTRATAMENTO SEGUIDO POR INCUBAÇÃO À PRESSÃO AMBIENTE

Visando observar o acúmulo de espécies reativas em células incubadas à pressão ambiente após o piezotratamento, realizou-se a análise de intensidade de fluorescência do corante CM-H<sub>2</sub>DCFDA em células da linhagem BT0510 submetida aos tratamentos de 50 MPa por 30 min e 50 MPa por 30 min seguida por incubação à pressão ambiente por 15 min.



Os resultados obtidos por citometria de fluxo (Figura 17) demonstraram que células de *S. cerevisiae* expostas ao tratamento de 50 MPa por 30 minutos seguido por incubação a pressão ambiente por 15 minutos, apresentaram uma redução da intensidade de fluorescência comparadas com células submetidas ao tratamento de 50 MPa por 30 minutos e analisadas imediatamente após o estresse. Sendo que, não foi observado diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre o tratamento com alta pressão hidrostática seguido por incubação a pressão ambiente e o grupo controle de células mantidas a pressão ambiente (Figura 18).

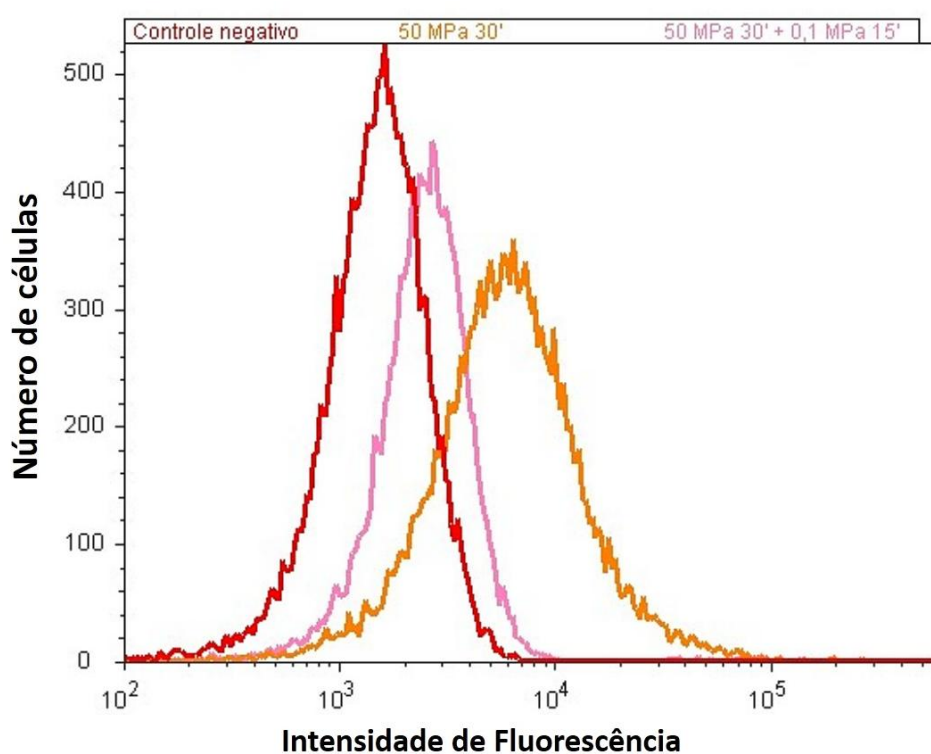


Figura 17: Histograma da intensidade de fluorescência emitida pelo corante CM-H<sub>2</sub>DCFDA em células de *S. cerevisiae* submetida ao tratamento de alta pressão hidrostática de 50 MPa por 30 min (laranja) e 50 MPa por 30 min seguido de incubação à pressão ambiente por 15 min (rosa claro). O controle negativo (vermelho), refere-se às células mantidas a pressão atmosférica – 0,1 MPa. Os experimentos foram realizados em triplicata, mas somente uma replicata está representada.

Já foi demonstrado que células de *S. cerevisiae* expostas ao tratamento de 50 MPa por 30 minutos seguido por incubação a pressão ambiente por 15 minutos, apresentam uma maior indução de genes relacionados à resposta das células ao estresse em comparação com as células analisadas imediatamente após o estresse, confirmando que o período pós tratamento com alta pressão hidrostática é

fundamental para recuperação das células, possibilitando a efetiva indução dos mecanismos de resposta a pressão hidrostática (BRAVIM et al., 2013; FERNANDES et al., 2004; PALHANO et al., 2004a).

Essas observações são coerentes com os dados obtidos no presente trabalho, visto que a redução na intensidade de fluorescência na amostra mantida por 15 min à pressão ambiente, está relacionada com o período de recuperação que é exigido das células após o piezotratamento. Dessa forma, como os genes de resposta ao estresse tem uma maior indução após o período de recuperação, as células submetidas ao tratamento de 50 MPa por 30 min seguido por incubação a pressão ambiente por 15 min, induzem mais efetivamente as respostas antioxidantes que previnem o acúmulo de espécies reativas na célula, e por consequência é observado uma redução da intensidade de fluorescência.

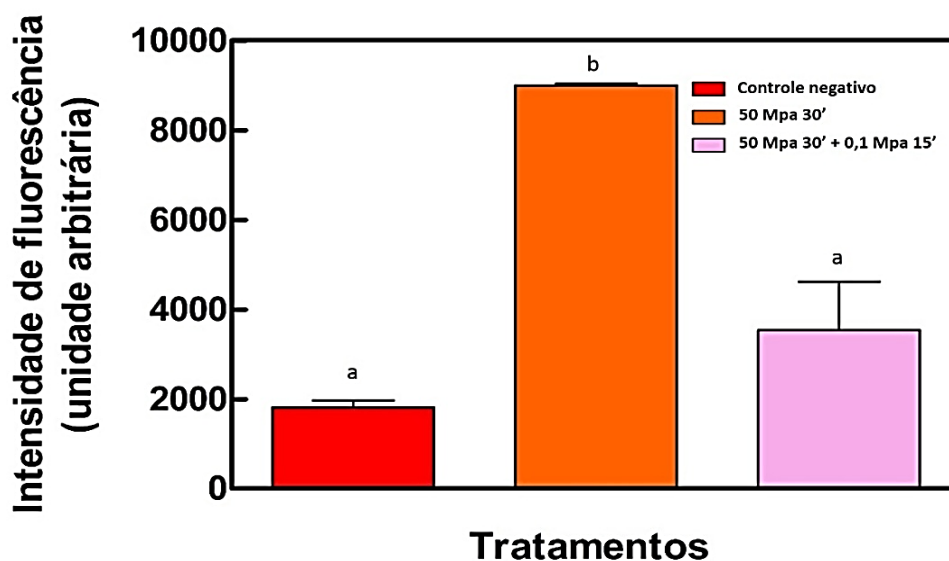


Figura 18: Representação do acúmulo de espécies reativas em células de *S. cerevisiae* após tratamento de pressão de 50 MPa por 30 min (laranja) e tratamento de pressão de 50 MPa por 30 min seguido de incubação à pressão ambiente por 15 min (rosa claro), e o controle negativo que corresponde as células mantidas a pressão atmosférica – 0,1 MPa (vermelho). As leveduras foram crescidas até a fase exponencial de crescimento antes de serem submetidas ao tratamento de estresse. O experimento foi realizado em triplicata (letras diferentes significa que existe diferença significativa entre os tratamentos –  $P < 0,05$ ).

#### 4.4. EXPRESSÃO GÊNICA

Com o objetivo de melhor compreender a redução do acúmulo de espécies reativas na célula após o tratamento de pressão hidrostática, foi realizada a análise por RT-PCR para comparar a expressão gênica de células da linhagem BT0510 submetidas

a dois tratamentos de pressão hidrostática: 50 MPa por 30 min e 50 MPa por 30 min seguido por incubação das células à pressão ambiente por 15 min. Diferentes genes relacionados com a resposta da célula ao estresse oxidativo foram escolhidos para esse análise (Tabela 2), sendo eles *CTT1*, *STF2*, *SOD2*, *ZWF1*, *MXR1* E *MXR2*.

*Tabela 2: Descrição dos genes utilizados na análise por RT-PCR*

<b>Gene</b>	<b>Função</b>
<b><i>CTT1</i></b>	Codifica a catalase citoplasmática que tem um importante papel na proteção ao dano oxidativo pelo $H_2O_2$
<b><i>STF2</i></b>	Envolvido na resistência a estresse por desidratação e exhibe propriedades antioxidantes
<b><i>SOD2</i></b>	Sintetiza a superóxido dismutase que protege as células ao dano oxidativo por ânion superóxido
<b><i>ZWF1</i></b>	Glicose-6-fosfatase desidrogenase envolvido na adaptação ao estresse oxidativo pela geração de NADPH
<b><i>MXR1</i></b>	Sintetiza a metionina sulfoxido redutase que está relacionada com a resposta ao dano oxidativo pela redução dos resíduos de metionina
<b><i>MXR2</i></b>	

O gene *CTT1*, codifica uma catalase citoplasmática envolvida na dismutação do  $H_2O_2$  em  $H_2O$  e  $O_2$  (Figura 5). Outro gene analisado foi o *SOD2* que sintetiza a superóxido dismutase mitocondrial que converte o ânion superóxido em peróxido de hidrogênio que pode então ser reduzido a água pelas catalases e peroxidases (MORANO et al., 2012). Enquanto que o gene *STF2* codifica uma proteína que modula a razão de hidrólise de ATP por uma ATPase, e tem sido também relacionada com a resposta ao dano oxidativo na célula (LÓPEZ-MARTÍNEZ et al., 2012; DIENHART, et al., 2002).

O gene *ZWF1*, também analisado no presente trabalho, codifica uma glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) citoplasmática que catalisa o primeiro passo irreversível da via das pentose-fosfato (Figura 19), a qual regenera NADPH a partir de  $NADP^+$ . Sabe-se que *ZWF1* está envolvido na proteção das células contra o estresse oxidativo, visto

que células de *S. cerevisiae* deficientes na G6PDH demonstraram maior suscetibilidade e foram incapazes de induzir adaptação ao estresse oxidativo. G6PDH promove resistência ao estresse oxidativo pela geração do poder redutor para reações de detoxificação (IZAWA et al., 1998; LEE et al., 1999).

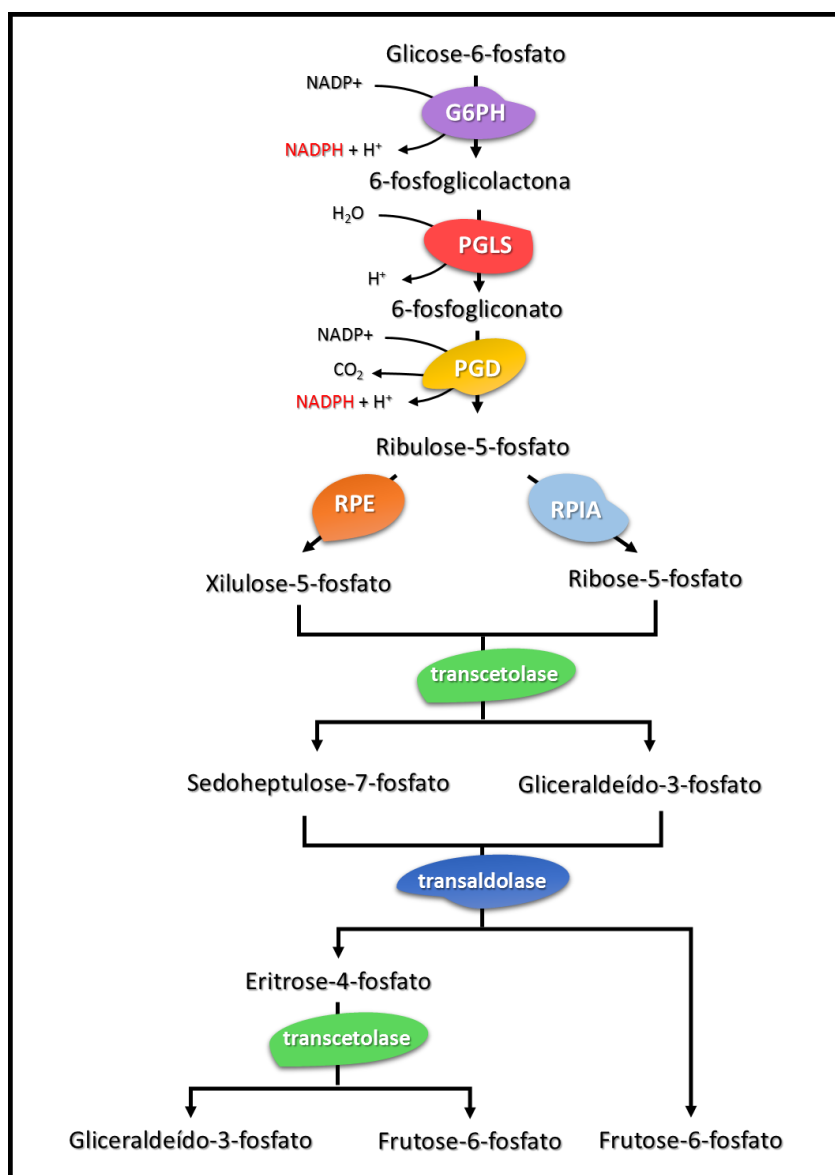


Figura 19: Representação esquemática da via das pentoses fosfato com geração de NADPH pela enzima glicose-6-fosfato desidrogenase sintetizada pelo gene ZWF1. G6PH, Glicose-6-fosfato desidrogenase; PGLS, fosfoglicolactonase; PGD, fosfogliconato desidrogenase; RPIA, ribulose-5-fosfato isomerase; RPE, ribulose-5-fosfato epimerase.

Por fim, os outros dois genes analisados foram *MXR1* e *MXR2*, que são responsáveis pela síntese da metionina sulfóxido redutase. Sabe-se que a oxidação dos resíduos

de metionina leva a formação de uma mistura racêmica de metionina-S-sulfoxido (Met-S-SO) e metionina-R-sulfoxido (Met-R-SO), e a metionina sulfoxido redutase catalisa a redução do grupo tiol dos resíduos de metionina oxidados (HERRERO et al., 2007; LE et al., 2009).

A análise da expressão gênica por RT-PCR (Figura 20) demonstrou que os níveis de expressão relativa, da maioria dos genes analisados, são maiores em células de *S. cerevisiae* submetidas ao tratamento de 50 MPa por 30 min seguido por incubação à pressão ambiente por 15 min. No entanto, não se observa uma diferença expressiva nos níveis de expressão relativa dos genes *MXR1* e *MXR2*, e como esses genes atuam no reparo ao dano oxidativo causado em proteínas, sugere-se portanto que a célula, em resposta ao tratamento de alta pressão hidrostática, despende energia no sentido de evitar ao máximo o dano às macromoléculas fundamentais para sua sobrevivência, visto que os genes *CTT1*, *STF2*, *SOD2* e *ZWF1* envolvidos nos mecanismos de detoxificação para evitar o acúmulo de espécies reativas na célula, foram altamente induzidos mediante tratamento com alta pressão hidrostática.

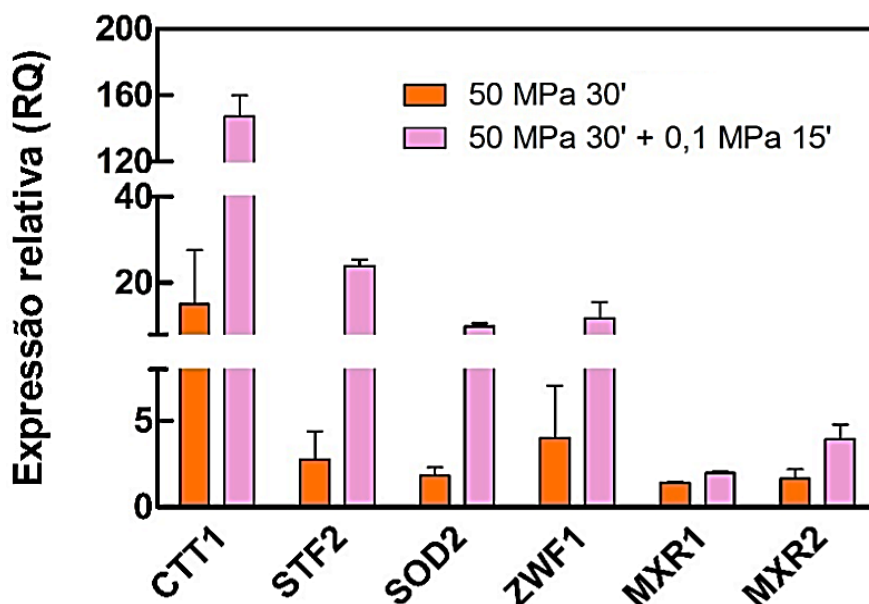


Figura 20: Nível de expressão relativa (RQ) dos genes por análise de RT-PCR em tempo real após tratamento de pressão de 50 MPa por 30 min (laranja) e tratamento de pressão de 50 MPa por 30 min seguido de incubação à pressão ambiente (rosa claro). Os genes testados foram *CTT1*, *STF2*, *SOD2*, *ZWF1*, *MXR1* e *MXR2* (representados no eixo Y). A intensidade na expressão destes genes foi normalizada pelo gene constitutivo *ALG9* não representado.

Análises de microarranjo de células de *S. cerevisiae* submetidas ao tratamento subletal e posteriormente mantidas por um curto período à pressão ambiente

demonstraram uma maior indução de genes de resposta ao estresse de alta pressão hidrostática, quando comparadas às células analisadas imediatamente após o piezotratamento. Resultados semelhantes foram obtidos no presente trabalho, visto que há uma maior indução dos genes de resposta ao estresse oxidativo em células mantidas à pressão ambiente após serem expostas ao tratamento de pressão. Enquanto as células estão sob uma pressão subletal elas são capazes de induzir genes responsivos ao estresse, porém, a tradução destes genes é comprometida devido à inibição do aparato de síntese proteica sob pressão; então, quando as células retornam para a pressão atmosférica após o tratamento sub-letal os novos mRNA sintetizados podem ser traduzidos (FERNANDES, 2004; PALHANO et al., 2004a).

Dessa forma, essa resposta ao dano oxidativo mais pronunciada após incubação à pressão ambiente, acarreta em um menor acúmulo de espécies reativas nas células mantidas à pressão ambiente após o tratamento de HHP, observada por análises de citometria de fluxo (Figura 18).

#### 4.5. COMPARAÇÃO DO ACÚMULO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO DAS LINHAGENS SELVAGEM E MODIFICADA APÓS O PIEZOTRATAMENTO

Visando observar a influência do gene *STF2* no acúmulo de espécies reativas na célula mediante tratamento de alta pressão hidrostática, realizou-se uma comparação na intensidade de fluorescência de CM-H<sub>2</sub>DCFDA após o piezotratamento entre duas linhagens de *S. cerevisiae*, BT0510 e BT0510-pSTF2. BT0510 consiste em um linhagem selvagem previamente isolada de destilaria (BRAVIM, 2007) e que foi utilizada nos demais experimentos, já BT0510-pSTF2 é uma linhagem geneticamente modificada (BRAVIM et al., 2013) que superexpressa o gene *STF2*.

Realizado o tratamento de 50 MPa por 30 min em ambas as linhagens, procedeu-se com a análise por citometria de fluxo. Os resultados obtidos demonstraram que a intensidade de fluorescência, após o piezotratamento, foi menor na linhagem modificada BT0510-pSTF2 do que na linhagem BT0510 (Figura 21). Já foi descrito que a proteína codificada pelo gene *STF2* exibe propriedades antioxidantes, evitando o acúmulo de espécies reativas na célula (LÓPEZ-MARTÍNEZ et al., 2012). Essas observações sugerem que a menor intensidade de fluorescência (Figura 22) em

células da linhagem modificada BT0510-pSTF2 após ser submetida ao estresse de pressão, deve-se às respostas antioxidantes induzidas pela superexpressão de *STF2*, reduzindo portanto o acúmulo de espécies reativas na célula, e por isso observa-se uma menor intensidade de fluorescência na linhagem BT0510-pSTF2.

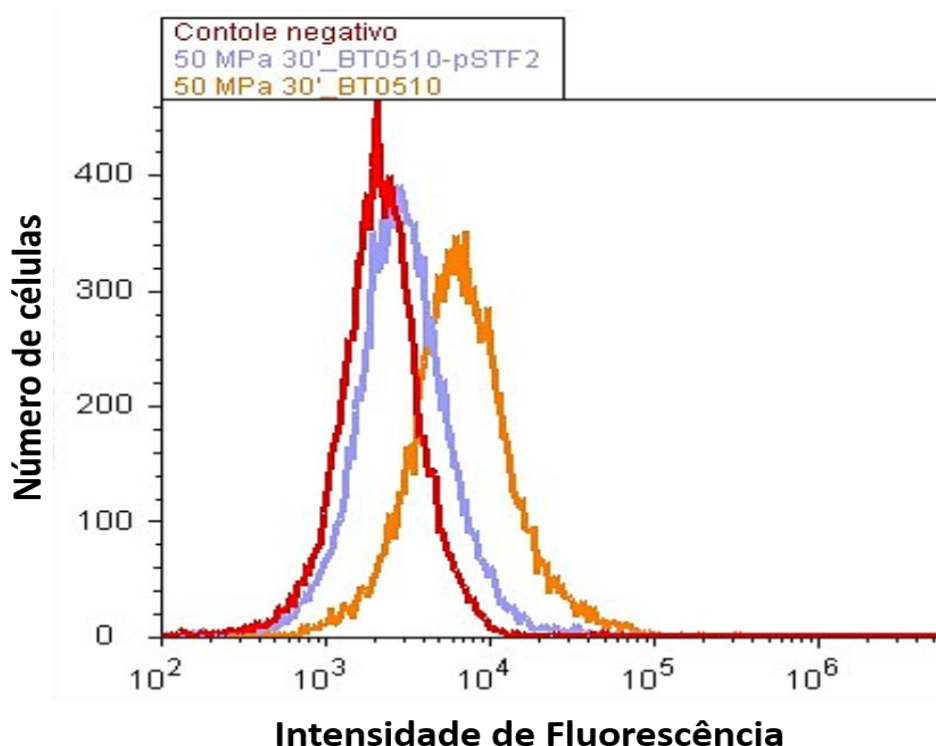


Figura 21: Histograma da intensidade de fluorescência emitida pelo corante CM-H<sub>2</sub>DCFDA comparando diferentes linhagens de *S. cerevisiae* após o tratamento de 50 MPa por 30. A comparação da intensidade de fluorescência foi feita entre a linhagem BT0510 (que não apresenta modificação - laranja) e a linhagem BT0510-pSTF2 (linhagem transformada com STF2 - lilás). E o controle negativo (vermelho), correspondem as células mantidas a pressão atmosférica 0,1 MPa. Os experimentos foram realizados em triplicata, mas somente uma replicata está representada.

O gene *STF2* sintetiza uma proteína citoplasmática que atua como fator de estabilização que aumenta a ação da proteína Inh1p, esta por sua vez atua inibindo a atividade da ATP sintase mitocondrial, de modo que Stf2p facilita a ligação de Inh1p na subunidade F1 da ATPase impedindo a hidrólise do ATP. Além disso, o que se discute é que Stf2p atue na estabilização de outras proteínas celulares, sugerindo portanto que Stf2p está envolvido na modulação da atividade de proteínas antioxidantes aumentando a capacidade dessas moléculas de remover as espécies reativas de oxigênio da célula (HONG; PEDERSEN, 2002; LOPEZ-MARTÍNEZ et al., 2012). Adicionalmente, a atividade antioxidante de Stf2p, pode estar relacionada com

a natureza hidrofílica dessa proteína, pois as proteínas hidrofílicas são caracterizadas por apresentarem um elevado teor de resíduos de aminoácidos carregados, assim como a histidina ou outros aminoácidos pequenos como a glicina, alanina, serina ou treonina que podem atuar na remoção de espécies reativas de oxigênio (AMARA et al., 2014).

Já foi descrito que a linhagem de *S. cerevisiae* com superexpressão do gene STF2 apresentam maior resistência mediante estresse de desidratação, além disso, a quantificação do acúmulo de espécies reativas por sonda fluorescente revelou que as células de levedura com capacidade de superexpressar STF2 apresentam uma redução na geração de espécies reativas, em comparação com células controle, demonstrando que o gene STF2 tem um papel muito importante na prevenção ao acúmulo de espécies reativas na célula (LOPEZ-MARTÍNEZ et al., 2012). Essas observações corroboram com os resultados apresentados, visto que há um menor acúmulo de espécies reativas na linhagem BT0510-pSTF2 submetida ao tratamento com alta pressão hidrostática.

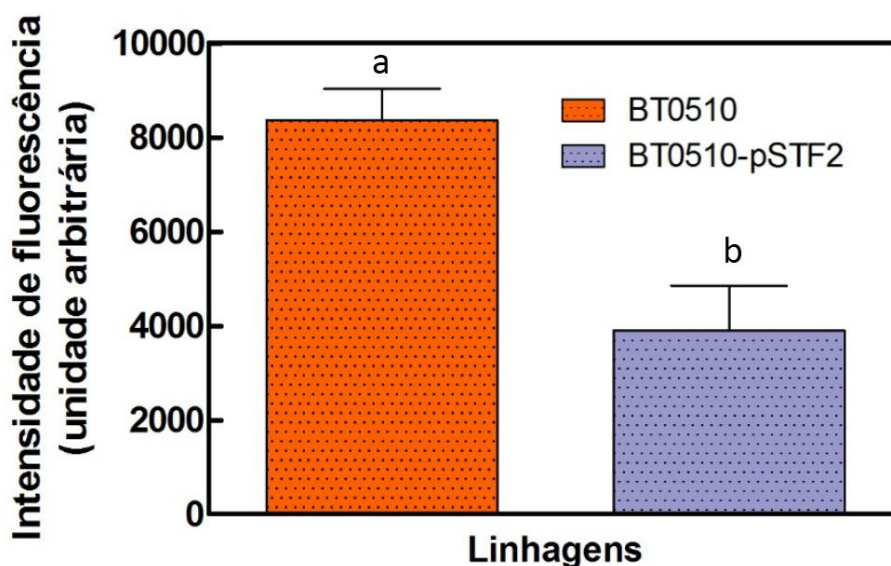


Figura 22: Representação do acúmulo de espécies reativas em células de *S. cerevisiae*. A comparação da intensidade de fluorescência foi feita entre a linhagem BT0510 (que não apresenta modificação - laranja) e a linhagem BT0510-pSTF2 (linhagem transformada com STF2 - lilás). As leveduras foram crescidas até a fase exponencial de crescimento antes de serem submetidas ao tratamento de estresse. O experimento foi realizado em triplicata (letras diferentes significa que existe diferença significativa entre os tratamentos –  $P < 0,05$ ).

Tem sido demonstrado que a linhagem transformada com a superexpressão do gene *STF2* (BT0510-pSTF2), apresenta uma maior produção de etanol em relação a



linhagem controle, que não apresenta modificação, após 48 horas de processo fermentativo. Diferentemente da linhagem controle em que há uma redução da porcentagem de etanol, BT0510-pSTF2 mantém a produtividade até 72 horas do processo fermentativo (BRAVIM et al., 2013). Estes resultados demonstram a importância dos mecanismos de defesa aos danos oxidativo nas células de levedura para o melhoramento do processo fermentativo, sendo fundamental a compreensão da resposta das células a este estresse, possibilitando a seleção de linhagens resistentes ao estresse oxidativo.

## 5. CONCLUSÕES

A alta pressão hidrostática, assim como outros estresses ambientais, induz ao estresse oxidativo em células de *S. cerevisiae*. O presente estudo comprovou este efeito através do aumento da intensidade de fluorescência nas células de levedura submetidas à alta pressão hidrostática e, conseqüentemente, por um maior acúmulo de espécies reativas nas células após o piezotratamento.

Por outro lado, não foi observado aumento na intensidade de fluorescência de células de levedura submetidas aos estresses térmico, osmótico e de etanol. Dados da literatura indicam que essas condições de injúria causam estresse oxidativo. Sugerimos, portanto, que estes estresses promovem uma resposta mais eficaz às células, que são capazes de induzir respostas aos danos oxidativos que previnem o acúmulo de espécies reativas. Alta pressão hidrostática exige das células um período de recuperação após o tratamento para induzir mais efetivamente mecanismos de resposta ao estresse oxidativo.

O estresse oxidativo promovido pela alta pressão hidrostática pode estar relacionado com a disfunção da atividade metabólica da mitocôndria, e além disso foi sugerido que o retículo endoplasmático influencia na geração de espécies reativas pelas células após o piezotratamento. Por fim, foi demonstrado que a alta pressão hidrostática ativa a lançadeira glicerol-3-fosfato que pode atuar como fonte de espécies reativas.

As análises por citometria de fluxo demonstraram que células de *S. cerevisiae* submetidas ao tratamento de 50 MPa por 30 min, apresentaram maior acúmulo de espécies reativas quando comparadas às células submetidas à alta pressão hidrostática e mantidas por 15 min à pressão ambiente. Concluindo-se que o segundo tratamento induz mecanismos de resposta ao dano oxidativo que previnem o acúmulo de espécies reativas na célula. Adicionalmente, a maior expressão de genes relacionados à resposta ao estresse oxidativo mediante tratamento de pressão ocorreu, principalmente, após o período de incubação à pressão ambiente, confirmando que as células precisam deste período para responder mais eficientemente ao estresse de alta pressão hidrostática.

A linhagem modificada com superexpressão do gene *STF2* (BT0510-pSTF2) demonstrou uma maior capacidade de responder aos danos oxidativos gerados pelo

tratamento da alta pressão hidrostática, visto que células da linhagem BT0510-pSTF2 submetidas à alta pressão previnem o acúmulo de espécies reativas. A capacidade aumentada na produção de etanol da linhagem BT0510-pSTF2 reforçam a importância dos mecanismos de defesa aos danos oxidativos nos processos industriais.

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é amplamente utilizada nas indústrias de panificação e de fermentação. Sabe-se que nos processos industriais a levedura é submetida a uma combinação de condições que afetam seu metabolismo, portanto para uma melhor eficiência desses processos, torna-se desejável que as células de levedura sejam resistentes a múltiplos estresses. Sendo que, o presente trabalho apresenta uma importante contribuição ao fornecer subsídios para elucidação das vias de resposta ao estresse em *Saccharomyces cerevisiae*.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AERTSEN, A; DE SPIEGELEER, P.; VANOIRBEEK, K.; LAVILLA, M.; MICHIELS C. W. Induction of oxidative stress by high hydrostatic pressure in *Escherichia coli*. **Appl. Environ. Microbiol.** v.71, p. 2226–2231, 2005.

AERTSEN, A. *et al.* Biotechnology under high pressure: applications and implications. **Trends in biotechnology**, v. 27, n. 7, p. 434-441, 2009.

AMARA, I. *et al.* Insights into Late Embryogenesis Abundant (LEA) proteins in plants: from structure to the functions. **American Journal of Plant Sciences**, v.5, p.3440-3455, 2014.

ARAÚJO, F. L., DIAS, M.V.C, BRITO, E.A. & OLIVEIRA JÚNIOR, S. Enriquecimento protéico de alimentos por levedura em fermentação semissólida: alternativa na alimentação animal. **Tecnol.&Ciên.Agropec.**, João Pessoa, v.3, n.3, p.47-53, 2009.

BENEY, L.; GERVAIS, P. Influence of the fluidity of the membrane on the response of microorganisms to environmental stresses. **Applied of Microbiology and Biotechnology**, v. 57, n. 1-2, p. 34-42, 2001.

BRAVIM, F. **Isolamento e indução de resistência em leveduras para produção de cachaça**. Vitória, 2007. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Universidade Federal do Espírito Santo.

BRAVIM, F. *et al.* Biotechnological properties of distillery and laboratory yeasts in response to industrial stresses. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 37, n. 10, p. 1071-1079, 2010a.

BRAVIM, F.; FREITAS, J. M.; FERNANDES, A. A. R.; FERNANDES, P. M. B. High hydrostatic pressure and the cell membrane: Stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v.1189, p. 127–132, 2010b.

BRAVIM, F. **Utilização da alta pressão hidrostática como ferramenta biotecnológica: indução de resistência em levedura para a produção de cachaça**. Vitória, 2011. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Espírito Santo.

BRAVIM, F. *et al.* High hydrostatic pressure activates gene expression that leads to ethanol production enhancement in a *Saccharomyces cerevisiae* distillery strain. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 97, n. 5, p. 2093-2107, 2013.

DEMASI, A. P. D.; PERREIRA, G. A. G.; NETTO, L. E. S. Influences of cytosolic thioredoxin peroxidase I and of the mitochondrial functional state. **FEBS Journal**, v. 273, p. 805-816, 2006.

DIENTHART, M. *et al.* Formation of the yeast F1F0-ATP synthase dimeric complex does not require the ATPase inhibitor protein, Inh1. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 42, p. 39289-39295, 2002.

DOMITROVIC, T., FERNANDES, C. M., BOY-MARCOTTE, E., KURTENBACH, E. High hydrostatic pressure activates gene expression through Msn2/4 stress transcription factors which are involved in the acquired tolerance by mild pressure precondition *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Letters**, v. 580, p. 6033-6038, 2006.

DUINA, A. A.; MILLER, M. E.; KEENEY, J. B. Budding yeast for budding geneticists: a primer on the *Saccharomyces cerevisiae* model system. **Genetics**, v. 197, p. 33–48, 2014.

ESTRUCH, F. Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, p. 469-486, 2000.

FELDMANN, H. (Ed.). **Yeast: molecular and cell biology**. (2. ed) John Wiley & Sons, v.1, 2012.

FERNANDES, P. M. B. How does yeast respond to pressure? **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, n. 8, p. 1239-45, 2005.

FERNANDES, P. M. B et al. **Levedura: do pão à biotecnologia**. Vitória, ES: Edufes, 2009.

FLEURI, L. F., SATO, H. H. Produção, purificação, clonagem e aplicação de enzimas líticas. **Revista Química Nova**, v.28, nº.5, p.871-879, 2005.

FOLCH-MALLOL, J. L.; GARRAY-ARROYO, A.; LLEDÍAS, F.; ROUBLES, A. A. C. La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. **Revista Latinoamericana de Microbiología**, v. 46, p. 24-46, 2004.

FOGUEL, D.; SILVA, J. L. New insights into the mechanisms of protein misfolding and aggregation in amyloidogenic diseases derived from pressure studies. **Biochemistry**, v. 43, n. 36, p. 11361-11370, 2004.

FREITAS, J. M. et al. Influence of cellular fatty acid composition on the response of *Saccharomyces cerevisiae* to hydrostatic pressure stress. **FEMS Yeast Research**, v. 12, p. 871-878, 2012.

GASH, A. P. The environmental stress response: a common yeast response to diverse environmental stresses. In: HOHMANN, S.; MAGER, W. H. (Ed.). **Yeast stress response**. 2. nd. Alemanha: Springer, p. 11-57, 2003.

GOFFEAU, A. et al. Life with 6000 genes. **Science**, Estados Unidos, v. 274, n. 5287, p. 546-549, 1996.

HERRERO, E.; ROS, J.; BELLÍ, G.; CABISCOL, E. Redox control and oxidative stress in yeast cells. **BBA**, v. 1780, p. 1217-1235, 2007.

HIRASAWA, T.; FURUSAWA, C.; SHIMIZU, H. *Saccharomyces cerevisiae* and DNA microarray analyses: what did we learn from it for a better understanding and exploitation of yeast biotechnology? **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 2, p. 391-400, 2010.

HOHMANN, S.; MAGER, W. H. Introduction. In: HOHMANN, S.; MAGER, W. H. (Ed.). **Yeast stress response**. 2. nd. Alemanha: Springer, 2003.

HONG, S.; PEDERSEN, P. L. ATP synthase of yeast: structural insight into the different inhibitory potencies of two regulatory peptides and identification of a new potential regulator. **ABB**, v. 405, p.38-43, 2002.

IWAHASHI, H. et al. Piezophysiology of genome wide gene expression levels in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Extremophiles**, v. 7, n. 4, p. 291-298, 2003.

IWAHASHI, H. et al. Adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to high hydrostatic pressure causing growth inhibition. **FEBS Letters**, v. 579, n. 13, p. 2847-2852, 2005.

IZAWA, S. et al. Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase in the adaptive response to hydrogen peroxide in *Saccharomyces cerevisiae*. **The Biochemical Journal**, v. 330, p. 811-817, 1998.

JAMIESON, D. Oxidative stress response of the *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 14, p.1511-1527, 1998.

KARATHIA, H.; VILAPRINYO, E.; SORRIBAS, A.; ALVES R. *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism: a comparative study. **PLoS One**, v. 6, p.1–10, 2011.

KREGER-VAN RIJ, N. J. W. Classification of yeast. In: ROSE A. H., HARRISON, J. S. (Ed.). **The yeasts**. 2. ed. London: Academic Press, p. 5-61, 1987.

LARSSON, C.; PAHLMAN, I.; ANSELL, R.; RIGOULET, M.; ADLER, L.; GUSTAFSSON, L. The importance of the glycerol 3-phosphate shuttle during aerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v.14, p.347-357, 1998.

LEADSHAM, J. E. et al. Loss of cytochrome c oxidase promotes ras-dependent ros production from the ER resident NADPH oxidase, Yno1p, in yeast. *Cell Metabolism*, v. 18, p. 279–286, 2013.

LEE, J. et al. Yap1 and Skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast. **The Journal of Biological Chemistry**, Estados Unidos, v. 274, n. 23, p.16040-16046, 1999.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. São Paulo: Ed. Sarvier, 2007.

LOPES, M. L. M., MESQUITA, V. L. V., CHIARADIA, A. C. N., FERNANDES, A. A. R., FERNANDES, P. M. B. High Hydrostatic Pressure Processing of Tropical Fruits: Importance f or maintenance of the natural food properties. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1189, p. 6 - 10, 2010.

LÓPEZ-MARTINEZ, G.; RODRÍGUEZ-PORRATA. B.; MARGALEF-CATALÀ, M.; CORDERO-OTERO, R. The STF2p hydrophilin from *Saccharomyces cerevisiae* is required for dehydration stress tolerance. **Plos One**, v. 7, p. 1-10, 2012.

MAGER, W. H.; FERREIRA, P. M. Stress response of yeast. **Biochem. J.**, p. 1-13, 1993.

MENTRÉ, P.; HUI BON HOA, G. Effects of high hydrostatic pressures on living cells: A consequence of the properties of macromolecules and macromolecule associated water. **International Review of Cytology**, v. 201, p. 1-84, 2001.

MOLINA-GARCIA, A. D. The effect of hydrostatic pressure on biological systems. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, Inglaterra, v. 19, p. 3-53, 2002.

MARTINEZ-MONTANÉS, F.; PASCUAL-AHUIR, A.; PROFT, M. Toward a genomic view of the gene expression program regulated by osmostress in yeast. **OMICS**, v. 14, p. 619-627, 2010.

MORANO, K. A.; GRANT, C. M.; MOYE-ROWLEY, W. S. The response to heat shock and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 190, p.1157–1195, 2012.

MURPHY, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. **Biochem. J.**, v.417, p.1–13, 2009.

NEVOIGT, E. Progress in Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae*, **Microbiol. Molec. Biol. Rev.**, v. 72, n. 3, p. 379–412, 2008.

PALHANO, F. L. et al. Pressure response in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: from cellular to molecular approaches. **Cellular and Molecular Biology**, v. 50, n. 4, p. 447-457, 2004.

PAULSEN, C. E.; CARROLL, K. S. Chemical dissection of an essential redox switch in yeast. **Chemistry & Biology**, v. 16, p. 217–225, 2009.

PEREGO, P.; JIMENEZ, G. S.; GATTI, L.; HOWELL, S. B.; ZUNINO, F. Yeast mutants as a model systems for identification of determinants of chemosensitivity. **Pharmacol Rev**, v.52, p.477–491, 2004.

QUEROL, A.; FERNÁNDEZ-ESPINAR, M. T.; OLMO, M.; BARRIO, E. Adaptive evolution of wine yeast. **International Journal of Food Microbiology**, v. 86, p. 3-10, 2003.

RAY, A.; MARTINEZ, B. A.; BERKOWITZ, L. A.; CALDWELL, L. A.; CALDWELL, K. A. Mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and neurodegeneration elicited by a bacterial metabolite in a *C. elegans* Parkinson's model. **Cell Death and Disease**, p. 1-12, 2014.

RIVALAIN, N.; ROQUAIN, J.; DEMAZEAU, G. Development of high hydrostatic pressure in biosciences: Pressure effect on biological structures and potential applications in Biotechnologies. **Biotechnology Advances**, p. 659–672, 2010.

ROKHLENKO, O., WEXLER, Y., YAKHINI, Z. Similarities and differences of gene expression in yeast stress conditions. **Bioinformatics**, v. 23, p. 184-190, 2006.

SCHUWARTZ, C. et al. Aplicações da alta pressão hidrostática nas Ciências da Saúde. **Revista Brasileira de Pesquisa em Saúde**, v. 13, p. 62-72, 2011.

SIMONATO, F. et al. Piezophilic adaptation: a genomic point of view. **Journal of Biotechnology**, v.126, n. 1, p.11-25, 2006.

SOMERO, G. N. Adaptations to high hydrostatic pressure. **Annual review of physiology**, v. 54, n. 1, p. 557-577, 1992.

STRASSBURG, K. *et al.* Dynamic transcriptional and metabolic responses in yeast adapting to temperature stress. **OMICS A Journal of Integrative Biology**, v. 14, n. 3, p. 249-259, 2010.

TARGINO, B. N. **Influência da variedade de cana-de-açúcar e do tipo de fermento na qualidade da cachaça de alambique**. Viçosa, 2009. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa.

TREVISOL, E. T. V.; PANEK, A. D.; MANNARINO, S. C.; ELEUTHERIO, E. C. A. The effect of trehalose on the fermentation performance of aged cells of *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbial and Cell Physiology**, p. 697-704, 2011.

TROTT, A.; MORANO, K. A. The yeast response to heat shock. In: HOHMANN, S.; MAGER, W. H. (Ed.). **Yeast stress response**. 2. nd. Alemanha: Springer, p. 71-119, 2003.

WINDERICKX, J. et al. From feast to famine; Adaptation to nutrient availability in yeast. In: HOHMANN, S.; MAGER, W. H. (Ed.). **Yeast stress response**. 2. nd. Alemanha: Springer, p. 305-386, 2003.

YAYANOS, A. A. Microbiology to 10,500m in the deep sea. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 49, p. 777-805, 1995.